

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Etudes expérimentales sur la Syphilis

PAR EL. METCHNIKOFF ET EM. ROUX

(TROISIÈME MÉMOIRE)

(Avec les planches V et VI).

I

LA SYPHILIS DU CHIMPANZÉ.

Après avoir établi que les chimpanzés sont sensibles à la syphilis (premier mémoire) et après avoir signalé que les accidents syphilitiques de ces anthropoïdes varient selon l'origine de la substance inoculée (deuxième mémoire), nous nous sommes mis à étudier les propriétés du virus syphilitique sous l'influence de divers facteurs. Une partie des résultats que nous résumons dans ce mémoire ont été communiqués par l'un de nous, à Berlin, en septembre dernier, au Congrès international de dermatologie.

La base fondamentale de nos études, c'est-à-dire la syphilis expérimentale des singes anthropoïdes, n'a plus besoin de preuves nouvelles. Après nos publications sur l'inoculabilité de la syphilis humaine au chimpanzé et sur la possibilité d'entretenir par passage le virus syphilitique chez ces anthropoïdes, M. Lassar¹ a obtenu la syphilis expérimentale sur un premier chimpanzé, inoculé avec du virus d'un chancre induré humain, et ensuite² chez un second chimpanzé, inoculé avec du virus syphilitique du premier.

1. *Berliner klin. Wochenschr.* 1903, p. 1189.

2. *Ibid.*, 1904, p. 801.

Plus tard M. A. Neisser¹ a rapporté les résultats des inoculations du virus syphilitique à plusieurs chimpanzés, dont quelques-uns ont manifesté des accidents primaires et secondaires des plus typiques. Il a en outre inoculé plusieurs orangs-outangs et un gibbon qui se montrèrent sensibles à la syphilis mais à un moindre degré que les chimpanzés.

En tout, nous avons inoculé jusqu'à présent, dix chimpanzés avec du virus syphilitique de diverses provenances et nous avons obtenu dix résultats positifs. Comme les deux expériences de M. Lassar ont été aussi couronnées de succès, il s'ensuit que douze chimpanzés inoculés ont tous pris la syphilis. Il est donc certain que cette maladie est inoculable à coup sûr aux chimpanzés, ce qui constitue un fait important pour l'étude expérimentale de la syphilis.

Sur les dix chimpanzés de nos expériences, sept ont été inoculés avec du virus humain de diverses origines. Tous ont reçu de la sérosité des chancres indurés de plusieurs individus et quatre ont été inoculés en outre avec le produit d'accidents secondaires : plaque muqueuse et syphilide chancriforme.

Un chimpanzé a été inoculé avec les exsudats du chancre et d'une syphilide papuleuse d'un autre anthropoïde. Un autre chimpanzé a reçu la sérosité de l'accident primaire d'un macaque bonnet chinois (*Macacus sinicus*), et un autre a été inoculé avec le produit d'un chancre du macaque de Buffon (*Macacus cynomolgus*). Les virus de toutes ces origines sont, comme nous l'avons déjà dit, inoculables aux chimpanzés.

L'inoculation se faisait presque toujours avec le scarificateur Vidal et consistait en petites scarifications nombreuses très superficielles, pratiquées aux arcades sourcilières, aux paupières et aux organes génitaux : clitoris, capuchon clitoridien, prépuce et verge. Dans quelques expériences, nous injections en outre, avec une seringue, du virus syphilitique sous la peau des cuisses. L'incubation de la syphilis d'origine humaine a varié entre 22 et 37 jours. Elle a été dans nos sept cas de 22, 22, 26, 33, 35 et 37 jours.

L'accident primaire débutait sous forme d'une petite tache à peine plus rose que les parties environnantes et faisant une saillie très légère (fig. 1). Quelquefois ces caractères étaient si

1. *Deutsche, medic. Wochenschr.*, 1904, p. 4369 et 4431.

peu prononcés au début que l'on pouvait hésiter sur leur signification, et ce n'est que plus tard que leur nature syphilitique s'accusait d'une façon indiscutable. Les taches rondes ou ovales ne tranchaient jamais brusquement sur les parties voisines, mais se confondaient avec elles graduellement.

Deux fois seulement nous avons vu apparaître au milieu des taches roses de petites vésicules fermées et remplies de liquide. C'était d'abord sur le prépuce clitoridien de notre premier sujet d'expérience, où la vésicule initiale était transparente; et, ensuite, sur la paupière supérieure d'un autre chimpanzé (fig. 3) où les deux petites taches roses du début se sont présentées le lendemain, couvertes de deux vésicules opalines, grisâtres, non transparentes (fig. 4). Bientôt après leur apparition, les vésicules s'aplatissaient et se transformaient en croûtes; d'abord très petites, celles-ci grandissaient progressivement.

Sauf ces deux cas exceptionnels, les vésicules ne se développaient jamais. Les petites taches roses présentaient, le lendemain ou plusieurs jours après leur apparition, de toutes petites squames dans leur partie centrale. Ces squames, d'abord sèches, se transformaient plus tard en croûtes jaunes ou brunâtres qui devenaient de plus en plus grosses, se fendaient et laissaient souvent suinter une sérosité claire. Au bout d'un nombre variable de jours, les lésions décrites se transformaient en chancres indurés très caractéristiques (fig. 2, 5). Leurs bords étaient saillants et le fond, après la chute de la croûte, se présentait sous forme d'une ulcération humide avec une surface pâle, lardacée. Ces chancres qui étaient le plus souvent multiples et se développaient parfois sur des portes d'entrée du virus très éloignées les unes des autres, telles que l'arcade sourcilière, les paupières et la cuisse, se maintenaient pendant des semaines et des mois. Leur guérison se faisait lentement et durait un nombre variable de jours.

Quelques jours après l'apparition de la lésion primaire, les ganglions lymphatiques de la région voisine s'hypertrophiaient. On sentait, à la palpation, un ou plusieurs ganglions durs, facilement mobiles et indolores à la palpation.

On voit bien, d'après cette description, que l'accident primaire chez le chimpanzé correspond sous tous les rapports à

celui de l'homme. Cet accident est suivi de manifestations secondaires, également comparables à celles de l'homme. Nous avons déjà décrit, dans un de nos mémoires, les syphilides papulo-squameuses qui s'étaient développées sur diverses parties du corps de notre premier chimpanzé syphilitique.

M. Lassar a observé des papules semblables sur la tête, les bras et surtout sur la plante des mains et des pieds de ses deux chimpanzés inoculés. Développées environ un mois après le début du chancre, ces syphilides présentaient tous les caractères typiques des lésions analogues chez l'homme. La nature syphilitique de cette affection cutanée était bien évidente d'elle-même; mais, pour lever toute hésitation, nous avons inoculé un peu du raclage d'une syphilide papuleuse de notre premier chimpanzé à un second individu du même genre. Ainsi que nous l'avons déjà rapporté dans un de nos mémoires, le résultat de cette expérience a été positif.

Depuis, nous avons observé des accidents secondaires chez deux autres de nos chimpanzés. Dix-huit jours après le début du chancre de l'arcade sourcilière, chez l'un d'eux se sont montrées sur la surface de la langue deux petites érosions superficielles avec des contours très marqués. Elles ont été suivies, deux jours plus tard, par l'apparition de deux nouvelles érosions analogues, plus rouges que le reste de la langue. Ces plaques se distinguaient par leur persistance et quelques-unes pouvaient être observées encore plus de six semaines après leur apparition. Environ 40 jours après le début des accidents secondaires, il est apparu sur la pointe de la langue deux nouvelles plaques muqueuses rouges avec un bord pâle et un peu relevé, très caractéristiques. Un peu plus tard se développa une plaque muqueuse des plus typiques sur la lèvre inférieure. (fig. 10) Chez un autre chimpanzé, des papules syphilitiques, au nombre de quatre, ont apparu à la face, 29 jours après le début de l'accident primaire et 66 jours après l'inoculation du virus. Ces papules guérirent environ deux semaines plus tard, ayant laissé des cicatrices blanches très marquées.

La nature syphilitique de ces lésions peut être d'autant moins mise en doute que l'inoculation du raclage d'une des premières érosions de la langue, faite à l'arcade sourcilière de

deux macaques (*Macacus sinicus* et *M. cynomolgus*) a été suivie d'accidents primaires très caractéristiques.

L'étude histologique des lésions syphilitiques des chimpanzés, faite d'abord avec le matériel de M. Lassar par MM. Becker et Mayer¹, et ensuite par MM. Arnal et Salmon², sur des pièces provenant de nos animaux, a démontré une analogie très grande avec la syphilis humaine. Dans les cas où ces lésions n'étaient pas modifiées par des infections surajoutées, elles étaient constituées par une grande accumulation d'éléments mononucléés et par une périartérite caractéristique.

Chez quelques-uns de nos chimpanzés syphilitiques, la rate se trouvait augmentée pendant la période secondaire et se maintenait à cet état pendant longtemps. Par contre, nous n'avons pu constater d'autres lésions d'organes. Chez le chimpanzé atteint d'érosions muqueuses de la langue et de la lèvre, nous avons observé une paraplégie qui s'est maintenue pendant plus d'un mois. Peut-être faut-il l'attribuer à l'infection syphilitique généralisée.

II

VIRUS SYPHILITIQUE FILTRÉ

Les faits que nous venons de résumer suffisent pour donner une idée générale de la syphilis expérimentale des chimpanzés. Après les avoir constatés il était important d'établir les propriétés du virus syphilitique, si pathogène pour ces anthropoïdes.

Les recherches microscopiques que nous avons entreprises ne nous ont pas donné de résultat satisfaisant. L'examen minutieux de la sérosité retirée des vésicules initiales que nous avons décrites plus haut, nous a révélé la présence d'amas leucocytaires, ainsi que d'un certain nombre de globules rouges, mais ne nous a permis de distinguer aucun microbe. Les granulations minuscules du liquide — évidemment quelques débris cellulaires — n'ont pas accusé de mouvements que l'on pût attribuer au choc produit par le voisinage de microbes mobiles. Si les parasites de la syphilis étaient des spirilles beaucoup plus

1. *Berliner Klin. Woch.*, 1993, p. 1192.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1

petits que ceux d'Obermeier ou de la spirillose brésilienne des oiseaux, on aurait pu constater leur présence par les mouvements des corpuscules, suspendus dans la sérosité syphilitique. L'absence de ces mouvements fait plutôt supposer qu'il s'agit dans la syphilis d'un microbe immobile. L'addition, à la sérosité, de rouge neutre, qui fait si bien apparaître les spirilles des oiseaux, n'aboutit à aucun résultat dans la recherche du microbe syphilitique.

On pourrait donc supposer qu'il s'agit ici d'un de ces microbes invisibles dont on est amené à admettre l'existence dans certaines maladies infectieuses, telles que la fièvre aphteuse ou la fièvre jaune. L'expérience récente de MM. Klingmüller et Baermann¹ plaide cependant contre cette supposition. Ces chercheurs se sont inoculé des produits syphilitiques humains, triturés avec de l'eau physiologique et filtrés à travers une bougie Berkefeld. Le résultat de plusieurs inoculations successives a été absolument négatif, d'où les auteurs ont conclu que le virus syphilitique était retenu par le filtre. Contre cette conclusion, on pourrait soulever l'objection que l'expérience a été exécutée sans contrôle. Il manquait un témoin pour prouver que le virus, traité par le procédé de Klingmüller et Baermann, mais non filtré, était bien capable de donner la syphilis. Le délai de plusieurs heures, nécessaire pour obtenir le liquide filtré, et l'eau dite physiologique qui servait pour la dilution, étaient peut-être déjà capables d'altérer la virulence. Comme il est inadmissible de se servir d'un être humain comme sujet de contrôle, on conçoit bien la supériorité des expériences, exécutées sur des anthropoïdes. Assurément moins héroïques, elles sont cependant plus concluantes et plus précises que celles que l'on fait sur l'homme.

Nous avons donc prélevé du virus sur les chancres indurés de la verge de deux hommes syphilitiques et sur deux syphilides chancreiformes d'une femme et nous l'avons dilué avec 2 c. c. d'humeur aqueuse de mouton, retirée aussitôt après l'abattage. Après la filtration de ce mélange à travers une bougie Berkefeld 12 A, nous avons inoculé un peu de ce liquide filtré à l'arcade sourcilière et à la cuisse d'un chimpanzé neuf, à l'aide du scarificateur de Vidal. Cette inoculation très superficielle n'a

1. *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1904, p. 766.

demandé que quelques gouttes de liquide. Le reste, c'est-à-dire de beaucoup la plus grande partie du mélange filtré, a été aussitôt après inoculé sous la peau de la cuisse du même animal. Toute l'opération, à partir du prélèvement du virus jusqu'à l'inoculation, n'a duré que 50 minutes. Le filtre employé pour cette expérience a été d'avance bien éprouvé par M. Dujardin-Beaumetz, qui a établi qu'il laisse passer le microbe de la péri-pneumonie des bovidés sans permettre le passage des bactéries, telles que vibrions des eaux et vibrions du choléra.

L'inoculation du virus filtré n'a donné lieu à aucun accident pathologique et n'a pas provoqué la moindre lésion syphilitique ou autre. Pour s'assurer que ce résultat négatif ne pouvait être attribué à l'altération du virus par l'humeur aqueuse du mouton ou par le temps nécessaire à la filtration du liquide, nous avons exécuté une expérience de contrôle sur un autre chimpanzé qui avait reçu les mêmes virus avec la même humeur aqueuse et aux mêmes endroits que le premier. La seule différence consistait en ceci que le chimpanzé de contrôle avait reçu le même mélange non filtré. Eh bien, le 37^e jour après l'inoculation, à l'arcade sourcilière de ce chimpanzé apparurent trois taches rondes et saillantes qui ne tardèrent pas à se transformer en trois chancres indurés des plus caractéristiques. Bientôt après, on a pu constater la tuméfaction du ganglion lymphatique au-dessous de l'angle de la mâchoire inférieure du même côté que les chancres. Peu de jours après se développèrent sur la peau de la cuisse inoculée deux chancres indurées des plus typiques.

La conclusion de cette expérience, exécutée d'une façon aussi précise que possible, est donc conforme au résultat de Klingmüller et Baermann : le virus syphilitique ne traverse pas la bougie Berkefeld qui laisse cependant passer le virus de la péri-pneumonie des bovidés.

III

VIRUS TRAITÉS PAR LA CHALEUR ET LA GLYCÉRINE

La filtration n'est évidemment pas le seul moyen capable d'enlever sa virulence au virus syphilitique. Comme les virus sont en général sensibles à l'action de températures plus ou moins élevées, il était tout naturel de se demander à quel

degré doit être chauffé le virus de la syphilis, pour être dépourvu de toute action pathogène. De nos expériences destinées à résoudre cette question, nous ne citerons que celle où nous nous sommes servis du virus syphilitique humain, mélangé avec de l'humour aqueux de mouton. Deux c. c. du mélange ayant servi à l'inoculation du chimpanzé témoin de l'expérience sur la filtration, ont été introduits dans un tube scellé et chauffés pendant une heure à 51°. Aussitôt après, quelques gouttes de ce liquide ont été inoculées par scarification à l'arcade sourcilière, à la paupière et à la cuisse d'un chimpanzé neuf, tandis que le reste, c'est-à-dire de beaucoup la plus grande partie, a été injecté sous la peau de la cuisse du même animal.

Le résultat a été absolument négatif, ce qui prouve que le chauffage prolongé pendant une heure à 51° suffit déjà pour dépouiller le virus syphilitique de toute sa virulence.

Le peu de résistance du virus syphilitique à la chaleur permet de supposer qu'il est également très sensible à l'action des substances chimiques. Pour résoudre cette question, nous nous sommes servi de virus syphilitique, mélangé à de la glycérine. Quelques gouttes de virus, provenant d'un chancre syphilitique de la verge d'un homme atteint de onze chancres simultanés, ont été mélangées *in vitro* avec plusieurs volumes de glycérine concentrée. Ce mélange a été aussitôt inoculé avec le scarificateur à l'arcade sourcilière, à la paupière supérieure et à la vulve d'une jeune chimpanzé. Comme d'habitude, les petites plaies, produites par l'instrument, ont été guéries en peu de temps. Mais 33 jours après l'inoculation, trois lésions tout à fait insignifiantes apparurent à l'arcade sourcilière qui, quelques jours plus tard, se transformèrent en trois chancres indurés des plus typiques. Dans une autre expérience semblable, le virus du chancre induré d'homme, mélangé avec de la glycérine, a provoqué chez un chimpanzé, 35 jours après l'inoculation, un accident secondaire des plus typiques. La conclusion n'est donc pas douteuse : la glycérine ajoutée dans les conditions que nous venons de dire, au virus syphilitique, ne lui enlève pas son pouvoir pathogène.

Les matières infectieuses, dépouillées de leur virulence, étant souvent capables de préserver l'organisme contre la maladie correspondante, il était tout naturel de se demander si le

virus syphilitique, après passage par le filtre ou bien après chauffage à 51°, ne pouvait pas être transformé en vaccin. Dans ce but, nous avons soumis nos deux chimpanzés mentionnés plus haut à une inoculation d'épreuve. Celui qui avait été traité avec du virus filtré a été, trois semaines après cette expérience, inoculé à l'arcade sourcilière et à la paupière supérieure avec un peu de virus, provenant d'un chancre syphilitique induré de la verge d'un homme, datant seulement de 5 jours et non accompagné d'adénopathie. Aussitôt après, le même anthropoïde reçut avec le scarificateur, à la peau de la cuisse, du virus, prélevé sur un chancre d'un autre individu atteint de syphilis.

Vingt-deux jours après cet essai, nous avons remarqué à l'arcade sourcilière, inoculée avec du virus non filtré, un petit point rose légèrement proéminent. En même temps, la partie de la cuisse, soumise à l'action du virus d'épreuve, est devenue rose, sans cependant faire la moindre saillie, ni accuser la moindre induration. Les jours suivants, la nature syphilitique des deux lésions ne fit aucun doute : le point rose de l'arcade sourcilière, auquel s'est bientôt ajouté un second point semblable, se transforma en chancre induré, recouvert d'une croûte épaisse. En même temps, la région rose de la cuisse se transforma en 6 petits chancres indurés qui ne tardèrent pas à confluer en un seul gros chancre très induré. Les ganglions de la région maxillaire et de l'aîne correspondantes aux chancres se tuméfièrent d'une façon considérable.

Le second chimpanzé, soumis d'abord à l'action du virus chauffé à 51°, a été, 24 jours plus tard, inoculé à l'arcade sourcilière, à la paupière supérieure, à la cuisse et à la verge, avec du virus syphilitique humain de même origine que celui du chimpanzé dont nous venons de relater l'histoire. Trente-trois jours après cette inoculation d'épreuve, la paupière supérieure nous fit apercevoir deux petites taches à peine plus roses que leur entourage. Ces taches, d'abord à peine distinctes, se transformèrent peu de jours plus tard en deux chancres indurés des plus typiques, qui furent bientôt suivis d'adénopathie de la région maxillaire correspondante.

Les deux expériences que nous venons de décrire imposent la conclusion que le virus syphilitique filtré, aussi bien que ce

virus chauffé à 51°, dans les conditions que nous avons précisées, sont incapables de vacciner l'organisme contre l'accident primaire. Peut-être les virus dépourvus de toute action pathogène et incapables de provoquer la moindre lésion locale sont-ils en général impropres à conférer l'immunité anti syphilitique.

Quelques faits que nous avons pu observer plaident en faveur de cette supposition. Un de nos chimpanzés a été d'abord inoculé avec du virus provenant d'un macaque (*Macacus cynomolgus*). La quantité de virus prélevée était très petite et le virus était mélangé avec du sang. Le résultat de cette inoculation a été absolument nul, de sorte que, 48 jours après, le même chimpanzé fut de nouveau inoculé avec du virus d'un autre macaque de même espèce. Cette fois-ci, la quantité de virus était plus abondante et l'inoculation, faite dans des endroits non touchés par la première expérience, fut suivie 49 jours plus tard du développement d'un chancre ecthymateux à l'arcade sourcilière et d'un autre à la paupière supérieure. La nature syphilitique de ces lésions était d'autant moins douteuse qu'elles furent bientôt suivies d'une forte hypertrophie de deux ganglions rétro-maxillaires du côté correspondant. Ces ganglions étaient mobiles et indolores et ont fourni un liquide qui provoqua chez trois macaques (*Macacus cynomolgus*) des accidents primaires très nets.

Notre chimpanzé n'a donc pas été préservé par la première inoculation du virus de macaque, inoculation n'ayant amené aucun processus local. Ce fait indique une fois de plus qu'un vaccin antisiphilitique doit être cherché plutôt parmi les virus capables de provoquer des accidents locaux, bien entendu aussi faibles que possible. Il est évident que le virus syphilitique de l'espèce de macaque que nous venons de mentionner (*Macacus cynomolgus*) est incapable de servir dans ce but. Inoculé en petite quantité, il ne donne lieu à aucun phénomène au point d'inoculation, tandis qu'introduit en quantité plus grande, il provoque des accidents beaucoup trop intensifs. Le chimpanzé dont nous n'avons rapporté qu'en partie l'histoire a manifesté plus tard des accidents secondaires sérieux. C'est chez lui que nous avons observé l'apparition d'érosions muqueuses à la langue et à la lèvre inférieure.

D'après nos expériences, le virus syphilitique s'atténue d'une

façon beaucoup plus grande après passage par une autre espèce de macaques, le macaque religieux des Hindous, ou bonnet chinois (*Macacus sinicus*). Dans notre second mémoire des Annales de l'Institut Pasteur, nous avons relaté l'histoire d'un chimpanzé, inoculé avec ce virus. Deux semaines après le début de l'expérience, il présenta des lésions tout à fait insignifiantes aux endroits inoculés, des petits points roses recouverts de petites squames qui disparurent au bout de quelques jours. Cet accident primaire si passager ne fut suivi d'aucune manifestation secondaire, mais le chimpanzé présenta plus tard une adéno-pathie généralisée. Un mois après la première inoculation, notre anthropoïde fut soumis à l'expérience d'épreuve : nous lui avons introduit par scarification du virus syphilitique d'origine humaine. Pendant les 3 mois 1/2 (104 jours) qu'a vécu le chimpanzé à partir de cette inoculation, il ne s'est développé chez lui aucun accident aux points de l'introduction du virus, ni la moindre manifestation secondaire à la peau et aux muqueuses. L'animal est mort en peu de jours d'une broncho-pneumonie double, causée par le pneumocoque. A l'autopsie, en dehors des lésions pulmonaires, les ganglions lymphatiques des aisselles, des aines et du mésentère ont été trouvés hypertrophiés, mais le ganglion cervical postérieur, qui était perceptible pendant la vie, n'a pu être retrouvé.

IV

SYPHILIS DES CATARRHINIENS INFÉRIEURS

Dans la recherche d'une vaccination antisymphilitique, les virus vivants atténués pouvant jouer un rôle considérable, il est important de se renseigner sur les manifestations de la syphilis chez les singes inférieurs. Jusqu'à présent, nous ne nous sommes servis que des singes de l'ancien continent, des Catarrhiniens, dans la supposition que les singes du nouveau monde, les Platyrrhiniens, beaucoup plus éloignés de l'homme, doivent jouir d'une plus grande immunité antisymphilitique.

Une espèce de macaques à queue courte, le *Macacus rhesus*, accuse une certaine sensibilité pour la syphilis. Sur trois individus, inoculés par scarification à divers endroits de la peau avec du virus humain, un seulement a présenté, 23 jours après, un chancre induré de l'arcade sourcilière. Cet accident primaire

était guéri au bout de trois semaines et n'était suivi ni d'adénopathie, ni d'accidents secondaires d'aucune sorte.

Les macaques à longue queue sont plus sujets à la syphilis. Chez les bonnets chinois, l'accident primaire, de peu d'intensité, a été constaté par Maurice et Charles Nicolle. Sur 20 singes de cette espèce, étudiés par nous, 10 seulement, soit 50 0/0, ont présenté des lésions aux points d'inoculation, consistant en un chancre peu ou pas induré, avec tendance à une guérison rapide.

L'adénopathie légère n'a pu être constatée que dans quelques cas; quant aux accidents secondaires, nous ne les avons jamais observés d'une façon tant soit peu précise. Les vieux bonnets chinois se sont montrés le plus souvent réfractaires à la syphilis; mais même parmi les jeunes, il s'en est trouvé un, âgé de peu de mois, qui a manifesté une immunité complète.

Un macaque de Buffon (*Macacus cynomolgus*) a pu être inoculé avec succès par M. Hamonic. Dans nos expériences il s'est montré plus sensible que le bonnet chinois. Ainsi sur 15 singes de cette espèce, inoculés par nous avec du virus syphilitique d'origine diverse (humaine et simiesque), 10, soit 66 0/0, ont manifesté des accidents primaires, analogues à ceux du bonnet chinois. Nous n'avons pu obtenir que des chancres au point d'inoculation, quelquefois une légère adénopathie locale et jamais d'accidents secondaires. Une fois il s'est développé, au voisinage du chancre, après sa guérison, une végétation pigmentée noire d'aspect semblable au loup. La nature de cette lésion n'a pu être déterminée d'une façon précise. Les spécialistes dermatologues et syphiligraphes ont émis des avis différents. Les uns déclaraient la lésion syphilitique; les autres, et parmi eux M. le professeur Fournier, supposaient plutôt quelque affection secondaire de la peau, non syphilitique.

Un magot (*Inuus ecaudatus*), ainsi que deux cercopithèques (*C. pathas* et *C. callitriche*) inoculés par nous avec du virus humain, ont accusé une immunité rebelle.

Parmi les cynocéphales, un jeune mandril (*C. mormon*.) inoculé avec du virus du chimpanzé syphilitique, s'est montré réfractaire, tandis qu'un jeune hamadryas (*C. hamadryas*), inoculé avec de la sérosité des syphilides chancriformes d'une femme, a présenté des lésions typhiques. Après une période d'incubation

de 35 jours, aux endroits inoculés de l'arcade sourcilière, se sont formés plusieurs points rouges, recouverts de petites squames sèches. Cette lésion a progressé pendant quelque temps et ne s'est guérie qu'après trois semaines, en laissant comme trace une traînée pigmentée noire. Pendant quelque temps il a été possible de sentir à la palpation un petit ganglion de la région sous-maxillaire, du même côté que le chancre. Pendant les quatre mois de l'expérience il ne s'est manifesté aucun accident secondaire de la peau ni des muqueuses.

Récemment M. Zabolotny a publié un mémoire¹, dans lequel il décrit les accidents syphilitiques, obtenus chez un papion (*C. sphynx*) avec du virus humain. Il a pu observer un chancre induré au point d'inoculation, à la verge, ainsi que des manifestations secondaires sous forme de roséoles et de papules. M. Zabolotny a fait quatre passages sur des singes de même espèce, et a constaté chez eux les mêmes accidents primaires et secondaires.

Nous avons inoculé d'abord deux papions sphynx aux arcades sourcilières, aux paupières, aux cuisses et aux organes génitaux, avec du virus syphilitique de provenance humaine. Chez l'un d'eux il s'est développé aux paupières supérieures, deux semaines après l'inoculation, une rougeur assez étendue, recouverte de plusieurs squames sèches superficielles. Il ne s'est produit ni induration, ni œdème des paupières, pas plus que de l'adénopathie. L'accident primaire s'est guéri au bout de trois semaines, en laissant après lui une traînée pigmentée noire. Jusqu'à présent, depuis plus de trois mois, nous n'avons encore constaté aucune manifestation secondaire de la syphilis.

Un second papion sphynx, inoculé avec le virus des plaques muqueuses de la verge et de la lèvre d'un homme, n'a présenté depuis les 89 jours que dure l'expérience aucun symptôme morbide.

Deux autres papions de la même espèce, que nous devons à l'obligeance de M. Laveran², ont présenté des lésions syphilitiques plus accusées. Il s'est développé chez eux, 17 jours après

1. *Archives des Sciences biologiques*. Saint-Petersbourg, t. XI, p. 155 (éd. russe).

2. Ces deux papions se sont montrés dans les expériences de M. Laveran absolument réfractaires aux trypanosomes de toute espèce. Il est donc peu probable que le microbe de la syphilis soit un trypanosome, comme on pourrait le supposer d'après l'analogie clinique entre la syphilis et la dourine des chevaux.

l'inoculation avec du virus du chancre humain, des squames multiples, recouvrant une partie très hypérémiée des paupières supérieures Fig. 6, 7. Cet accident n'était accompagné ni d'induration des parties affectées, ni d'œdème, ni d'engorgement ganglionnaire. La guérison s'est accomplie en moins de trois semaines et n'a été suivie jusqu'à présent, c'est-à-dire dans l'espace de trois mois, d'aucune manifestation secondaire.

D'après nos observations, les lésions syphilitiques des cynocéphales se rapprochent beaucoup plus de celles des macaques que de la syphilis des anthropoïdes et de l'homme.

Il est incontestable que l'étude de toutes ces variétés morbides présente un grand intérêt au point de vue de la lutte contre la syphilis de l'homme. S'il est possible de tirer une indication de ces expériences, il semble que c'est dans le passage par l'organisme des catta rhiniens inférieurs qu'il faille chercher l'atténuation du virus syphilitique pour en faire un vaccin. Si le virus des bonnets chinois se montre trop pathogène, il faudra recourir à des espèces moins sensibles, telles que le *Macacus rhesus*. Dans le but de bien régler l'action virulente, il y aura lieu de se servir de virus, combinés avec l'emploi de sérums spécifiques.

Malgré les doutes exprimés par M. A. Neisser, nous sommes absolument persuadés de la nature syphilitique des lésions expérimentales des macaques. Leur transmission aux chimpanzés et les manifestations primaires et secondaires chez ces derniers suffisent pour entraîner la conviction.

Depuis les recherches de MM. Richet et Héricourt, on a essayé à maintes reprises de préparer des sérums anti syphilitiques, mais toutes les tentatives faites jusqu'à présent n'ont donné que des résultats négatifs. Peut-être l'étude de la syphilis expérimentale des singes permettra-t-elle d'éclaircir cette question d'une façon plus précise. Peut-être les espèces peu sensibles fourniront-elles des sérums plus actifs que ceux qui ont été préparés jusqu'à présent avec des animaux réfractaires. D'un autre côté des essais de sérothérapie faits sur des chimpanzés, au début de la maladie, et comparés avec des témoins bien choisis, donneront peut-être des résultats plus probants que ceux qui ont pu être obtenus chez l'homme.

Il ne faut pas oublier que l'étude de la syphilis des animaux

ne fait que débiter et qu'après les recherches d'orientation que nous venons de rapporter, il reste encore un champ d'expérience très vaste à parcourir.

En terminant ce mémoire nous exprimons toute notre reconnaissance à M. le Dr Gentil gouverneur du Congo et à M. le Dr Tautin, secrétaire général de la Guinée, pour l'aide si précieuse qu'ils nous ont donnée en nous procurant des chimpanzés. Nous remercions aussi M. le Dr Pinard, médecin major des troupes coloniales, qui a mis généreusement à notre disposition un très beau chimpanzé qu'il avait ramené de la côte d'Afrique.

EXPLICATION DES FIGURES

Planche. V

Fig. 1. — Deux chancres de l'arcade sourcilière, au troisième jour. (Chimpanzé.)

Fig. 2. — Les mêmes chancres au dixième jour.

Fig. 3. — Deux petites taches syphilitiques du premier jour. (Chimpanzé.)

Fig. 4. — Les mêmes taches, transformées en vésicules.

Fig. 5. — Trois chancres du neuvième jour. (Chimpanzé.)

Fig. 6. — Accident primaire du *Papio Sphynx*. Sixième jour de la lésion.

Fig. 7. — Même accident au quatorzième jour.

Fig. 8. — Accident primaire du *Macacus sinicus*.

Planche. VI

Fig. 9. — Six petits chancres de la cuisse. Dixième jour de la lésion. (Chimpanzé.)

Fig. 10. — Plaques muqueuses de la langue et de la lèvre inférieure. (Chimpanzé.)

SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE ET LA FORMULE DE L'ADRÉNALINE

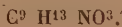
PAR M. GABRIEL BERTRAND

En raison de l'importance prise au cours de ces dernières années, tant au point de vue physiologique qu'au point de vue thérapeutique, par la substance active des glandes surrénales désignées communément sous le nom d'adrénaline¹, on s'est efforcé d'élucider la composition, les propriétés et jusqu'à la constitution chimique de cette substance remarquable.

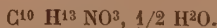
Malgré toutes les recherches, la formule brute de l'adrénaline n'est cependant pas encore établie avec certitude. Sans tenir compte des résultats obtenus à l'origine, avec des produits amorphes, par von Furth² et par Abel³, on est en présence, aujourd'hui, de trois formules principales : celle de Takamine⁴,



Celle d'Aldrich⁵ :



Et, enfin, la dernière, proposée par Abel⁶,



et maintenue par cet auteur, malgré les analyses de divers savants⁷.

1. Et quelquefois sous celui d'épinéphrine, de suprarenine, etc.

2. *Zeitscht. f. physiolog. Chem.*, t. XXVI, p. 45-47 (1898).

3. *Idem*, t. XXVIII, p. 348-362 (1899).

4. *American Journ. of pharm.*, t. LXXIII, p. 523-531 (1904).

5. *American Journ. of physiolog.*, t. V, p. 457 (1901).

6. *Bericht d. d. chem. Ges.*, t. XXXVI, p. 1839-1847 (1903), et t. XXXVII, p. 368-381 (1904).

7. VON FURTH, *Monatsh. f. chem.*, t. XXIV, p. 261-291 (1903). — JOWET, *Journ. of the chem. Soc.*, t. LXXXV, p. 192-197 (1904). — PAULY, *Bericht d. d. chem. Ges.*, t. XXXVI, p. 2944-2949 (1903), et t. XXXVII, p. 1388-1401 (1904). — ABDERHALDEN et BERGELL, *Id.*, t. XXXVII, p. 2022-2024 (1904).

COMPOSITION CHIMIQUE ET FORMULE DE L'ADRÉNALINE 673

Ces trois formules correspondent aux compositions centésimales suivantes :

	Takamine.	Aldrich.	Abel.
Carbone.....	60,91	59,01	58,82
Hydrogène.....	7,61	7,10	6,86
Azote.....	7,10	7,64	6,86

Elles s'accordent assez mal, le plus souvent, avec les données numériques expérimentales qui ont été publiées.

Si on cherche d'où proviennent ces divergences, on les trouve, en dehors des écarts possibles dus aux méthodes analytiques, tout d'abord dans la difficulté de préparer convenablement des quantités notables d'adrénaline : cette substance n'existe dans les glandes surrénales qu'en très minime proportion ; de plus, elle s'altère, principalement au contact de l'oxygène, avec une grande rapidité.

On est parvenu, il est vrai, dans les dernières expériences, à obtenir un produit blanc et tout à fait débarrassé du phosphate ammoniac-magnésien, qui, passé d'abord inaperçu, a dû fausser bien des analyses ; mais on n'a pas donné jusqu'ici la preuve de la pureté du produit soumis à la combustion. On s'est contenté, en général, de redissoudre et de reprécipiter en masse l'adrénaline que l'on voulait purifier ; on a recommencé plusieurs fois ces opérations, souvent en faisant varier les acides et les bases, mais on n'a jamais démontré si on avait affaire à une substance unique ou, au contraire, à quelque mélange de substances voisines. C'est à cause de cela que les recherches les plus consciencieuses n'ont point encore apporté le résultat définitif. J'ai repris en conséquence l'étude systématique de l'adrénaline. Ce sujet m'intéressait, d'ailleurs, d'une façon particulière, l'adrénaline étant, en fait, la seule substance connue, d'origine animale, qui soit oxydable par la laccase¹.

J'ai cherché d'abord un procédé de préparation de l'adrénaline qui donnât un produit aussi pur que possible ; puis, au lieu de soumettre directement ce produit à l'analyse élémentaire, je l'ai divisé, par deux séries de précipitations fractionnées, en petites portions correspondant chacune à environ 1/50 et même 1/60 de la masse initiale. C'est seulement par les résultats de l'analyse comparée de ces diverses portions qu'il a été pos-

1. G. BERTRAND, *Comptes rendus Ac. des Sc.*, t. CXXXVIII, p. 649-650 (1904).

sible de s'assurer de l'existence d'une seule et même substance dans la préparation examinée, et de conclure, du même coup, avec certitude, à la formule brute de l'adrénaline.

Les glandes dont je me suis servi sont celles du cheval. On les enlève aussitôt après l'abattage, on les débarrasse complètement de la graisse qui peut y adhérer, puis on les passe rapidement au hache-viande. On introduit alors 600 grammes de la bouillie obtenue dans un flacon de 2 litres à large ouverture; on ajoute 5 grammes d'acide oxalique en poudre fine, puis, peu à peu et en agitant, assez d'alcool à 95 degrés pour remplir le flacon jusqu'au col. On bouche bien et, après 2 jours de macération, pendant lesquels on agite de temps en temps, on jette le tout sur une toile; enfin, on exprime à la presse.

La solution est filtrée et concentrée dans le vide, à la température du bain-marie, de manière à chasser tout l'alcool: il se sépare une grande quantité de lécithine fortement colorée. Pour l'enlever, on agite doucement le liquide trouble avec de l'éther de pétrole, et on laisse reposer dans une allonge à robinet.

La couche inférieure est décantée, précipitée exactement par l'acétate neutre de plomb et centrifugée.

On obtient ainsi une solution limpide, faiblement colorée en jaune, que l'on distille dans le vide jusqu'au volume de 60 à 80 c. c. et que l'on additionne d'un petit excès d'ammoniaque.

L'adrénaline se précipite aussitôt à l'état cristallisé¹. Après une quinzaine de minutes, on la recueille à la trompe, on la lave à l'eau distillée, puis, afin de la purifier, on la redissout dans l'acide sulfurique à 10 0/0 (environ 2 fois et demi le poids de l'adrénaline supposée sèche). On ajoute à la solution 1 volume d'alcool et, après quelques instants de repos, on sépare à la trompe un peu de sulfate de plomb et de matières organiques insolubles. L'adrénaline est à nouveau précipitée par l'ammoniaque, lavée à l'eau, à l'alcool et desséchée dans le vide.

Toutes ces manipulations doivent être exécutées en évitant

1. Cette précipitation rappelle tout à fait celle du phosphate ammoniaco-magnésien; il faut remuer le liquide en évitant de frotter les parois du vase, sinon l'adrénaline s'y attache fortement.

Si on a employé trop d'acétate de plomb pour déféquer le liquide, l'addition d'ammoniaque produit un précipité plus ou moins gélatineux (combinaison plombique d'adrénaline?), difficile à filtrer. Il faut alors acidifier par l'acide sulfurique étendu, qui redissout l'adrénaline et insolubilise le plomb; filtrer et précipiter ensuite par l'ammoniaque.

le plus possible l'action de l'oxygène, en s'aidant même du gaz carbonique, dont on emplît les flacons ou les appareils où s'accomplissent les diverses parties du traitement.

Si on laisse une proportion notable de l'adrénaline se transformer en corps brun par oxydation, il devient très difficile, en effet, d'obtenir un produit blanc.

Les rendements diffèrent à peine de ceux qui ont été fournis à l'aide d'autres méthodes, par les glandes surrénales de bœuf, de mouton ou de porc : 118 kilogrammes d'organes frais, provenant de 3,900 chevaux, m'ont donné environ 125 grammes d'adrénaline cristallisée, aussi pure que possible.

Le fractionnement a été effectué, en deux séries de précipitations, sur 110 grammes du précieux alcaloïde. On a dissout cette quantité d'adrénaline dans 600 c. c. d'acide sulfurique normal, puis ajouté, en plusieurs fois, une quantité d'ammoniaque suffisante pour précipiter le corps basique. A cause de l'équilibre exercé entre l'adrénaline et l'ammoniaque, il a fallu mettre un excès sensible de cette dernière, calculé par rapport à la quantité théorique. Après chaque addition d'ammoniaque, on recueillait à la trompe les cristaux qui s'étaient précipités, on les lavait à l'eau distillée et à l'alcool, puis on les séchait dans le vide¹. On a obtenu ainsi sept portions :

La portion n° 1 pesait 14 grammes.

—	2	12 gr. 5.
—	3	12 grammes.
—	4	12 —
—	5	11 —
—	6	12 —
—	7	33 —

On a donc récupéré 106^{gr.} 5 de produit sur les 110 grammes. mis en œuvre. Chaque portion a maintenant été fractionnée à son tour de la même manière, afin d'augmenter les différences qui auraient pu exister entre les produits de tête et les produits de queue, dans le cas d'un mélange.

Portion n° 1. — Elle a donné 8 fractions de poids sensiblement égaux. La première de ces fractions, paraissant un peu trop colorée, n'a pas été soumise à l'analyse élémentaire. La seconde encore un peu jaune, a fourni les chiffres suivants :

1. Avant la dernière précipitation, on avait concentré la liqueur par distillation sous pression réduite.

	1 ^{re} analyse	2 ^e analyse
Carbone.....	58,53	58,46
Hydrogène.....	7,27	7,21
Azote.....		7,74

Ces chiffres sont peu éloignés, on le voit, de ceux qui correspondent à la formule d'Aldrich.

Les nombres donnés par l'analyse de la huitième fraction sont encore plus voisins, ils sont pour ainsi théoriques :

Carbone.....	58,78	
Hydrogène.....	7,25	
Azote.....		7,66

Portions nos 6 et 7. — Ces portions de queue ont été divisées respectivement en 6 et en 9 fractions, aussi à peu près égales entre elles, dans chaque série; on a analysé les dernières.

Queue de la portion 6 :

Carbone.....	58,83	
Hydrogène.....	7,19	
Azote.....		7,68

Queue de la portion 7 :

Carbone.....	58,72	
Hydrogène.....	7,30	
Azote.....		7,69

Ces résultats concordants montrent d'abord que l'adrénaline extraite des glandes surrénales du cheval est une substance unique et non pas un mélange, ensuite, que la formule proposée par Aldrich, pour en représenter la composition, reste seule admissible.

Le poids moléculaire, trouvé par la cryoscopie de l'adrénaline en solution acétique, correspond bien d'ailleurs à la formule



L'abaissement du point de congélation d'une solution de

COMPOSITION CHIMIQUE ET FORMULE DE L'ADRÉNALINE 677

0^{gr},985 de produit dans 38^{gr},250 de dissolvant a été, en effet, de 00^{gr},576 d'où :

$$P M = \frac{39 \times 0,985 \times 100}{38,250 \times 0,576} = 174,3$$

tandis que la théorie indique 183.

C'est là un point qu'il était nécessaire de fixer avant de pénétrer plus avant dans l'étude systématique de l'adrénaline.

Recherches sur l'agglutination des globules rouges

par les précipités chimiques

ET SUR LA SUSPENSION DE CES PRÉCIPITÉS

dans les milieux colloïdaux

PAR LE Dr OCT. GENGOU

(Travail de l'Institut Pasteur du Brabant.)

Les substances colloïdales jouent, dans les phénomènes vitaux, un rôle tellement considérable que les biologistes s'attachent à suivre avec attention les progrès faits par la chimie et la physique dans l'étude de ces substances. L'analyse des propriétés des colloïdes organiques est fortement compliquée par l'ignorance où nous sommes de leur composition ; aussi est-il naturel qu'on se reporte volontiers aux renseignements que nous donne l'étude de colloïdes plus simples. On se borne, du reste, le plus souvent à chercher dans les règles qui suivent les réactions des colloïdes inorganiques, l'explication des observations faites sur les substances colloïdales du monde vivant. Parmi les phénomènes présentés par ces deux groupes de substances, il en est un qui prête beaucoup à la comparaison, c'est celui de l'agglutination. Les travaux qui s'en occupent abondent ; mais les récentes publications de Perrin sur les substances colloïdales ont provoqué chez les biologistes des recherches des plus actives sur ce phénomène.

L'agglutination des microbes et des globules par les sérums, notamment par les sérums spécifiques, si fouillée déjà, intrigue cependant encore ; son essence même nous échappe. L'analogie d'aspect qu'elle présente avec la précipitation des colloïdes, a fait naître l'espoir d'en trouver l'explication dans l'analyse méthodique de cette dernière. Aussi sont-ils déjà nombreux, les travaux où depuis les publications de Perrin, on s'est occupé soit de la précipitation des colloïdes, soit de l'agglutination des globules rouges par des substances en suspension (colloïdes, précipités chimiques), soit d'un rapprochement entre ces deux phénomènes.

Ce sont, pensons-nous, Landsteiner et Jagic¹ qui ont, les premiers, signalé l'agglutination des globules rouges par un colloïde bien défini, l'acide silicique colloïdal. Peu après, nous avons nous-même² relaté des exemples d'agglutination et d'hémolyse des globules rouges par les précipités chimiques, tels que CaF_2 , BaSO_4 . M^{me} Girard-Mangin et M. V. Henri³ ont, à leur tour, étudié la question d'une façon très étendue et très minutieuse, au moyen de colloïdes divers.

Ainsi que nous l'avons montré antérieurement, certains précipités chimiques, de même que les colloïdes, agglutinent les globules rouges, à la condition que ceux-ci soient lavés de tout sérum; cette agglutination est suivie de l'hémolyse des globules, phénomène sur lequel nous avons déjà fourni quelques indications dans notre première note². Cette agglutination et cette hémolyse sont, au contraire, empêchées par la présence de quantités même très faibles de sérum.

Nous nous occuperons ici uniquement de l'agglutination des globules; nous comptons revenir plus tard sur leur dissolution. M^{me} Girard-Mangin et V. Henri ont vu que l'agglutination des globules se produit aussi bien avec des colloïdes négatifs qu'avec des colloïdes positifs. Cependant, les globules rouges sont, par le passage d'un courant électrique, déplacés vers l'anode³, ce qui autorise à les considérer comme ayant une charge électrique négative, ainsi qu'on l'a fait pour les colloïdes qui suivent la même direction sous l'influence d'un courant électrique. Cette agglutination d'une émulsion négative (globules) par des colloïdes également négatifs, ne cadre évidemment pas avec les idées généralement admises sur la façon dont se comportent les uns vis-à-vis des autres des colloïdes possédant des charges électriques de même signe. Dans un mélange de colloïdes de même signe électrique, en effet, il ne se produit pas de floculation; les deux colloïdes restent en suspension⁴. Aussi M^{me} Girard-Mangin et V. Henri n'admettent-ils pas que l'agglutination des globules rouges par les colloïdes soit due à une action directe de ces éléments les uns sur les autres. Pour eux, cette agglutination n'est qu'un fait indirect, secondaire; le globule ne joue dans ce phénomène

1. LANDSTEINER ET JAGIC, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1904, n° 3.

2. GENGOU, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 11 avril 1904.

3. M^{me} GIRARD-MANGIN ET V. HENRI, *Soc. de Biol.*, 1904, nos 19, 20, 21, 24, 25.

4. HENRI, LALOU, MAYER ET STODEL, *Soc. de Biol.*, 1903, 19 décembre.

qu'un rôle passif; les rôles actifs sont tenus par les colloïdes d'une part, de l'autre par les sels endoglobulaires que les globules laissent diffuser dans le liquide.

On sait, en effet, qu'un certain nombre de colloïdes — et c'est le cas pour ceux que M^{me} Girard-Mangin et V. Henri ont étudiés — sont floculés par les électrolytes. Or, quand des globules rouges séjournent dans de l'eau physiologique, ils laissent diffuser leurs sels, et il est bien évident que ceux-ci, pendant toute la durée de leur diffusion hors de l'hématie, seront plus abondants dans la zone périglobulaire, immédiatement voisine du globule, que dans le liquide interglobulaire situé à quelque distance de ce globule. Aussi, pensent M^{me} Girard-Mangin et V. Henri, les colloïdes introduits dans une émulsion de globules qui laissent diffuser leurs sels seront-ils de préférence précipités dans la zone périglobulaire, plus concentrée.

A ce premier acte en succéderait un second, dans lequel les particules de colloïde, floculées autour des globules par les sels endoglobulaires, se rassembleraient en paquets, entraînant avec elles les globules; d'où la formation d'amas constitués de colloïdes et de globules.

Dans cette théorie, l'agglutination des globules par les colloïdes repose sur la précipitation *préalable* de ces derniers autour des globules, par les électrolytes endoglobulaires diffusés. Les globules restent pendant toute l'action absolument passifs; ils sont simplement entraînés par suite du rapprochement des particules de colloïdes précipitées autour d'eux.

Nous ne pensons pas qu'il faille interpréter de la sorte le phénomène de l'agglutination des globules par les colloïdes; pour nous, cette agglutination a pour point de départ une action directe de ces éléments l'un sur l'autre¹. Nous croyons que nous pouvons en effet rapporter à l'agglutination des globules par les colloïdes, les conclusions qui découlent de faits que nous avons observés en remplaçant les colloïdes par les poudres, — ils sont du reste du même ordre; nous nous basons en cela sur l'opinion de Bredig², qui pense que les solutions colloïdales et

1. Il va de soi qu'il ne s'agit pas ici de discuter l'action, démontrée depuis longtemps, des sels dans les phénomènes d'agglutination en général; nous ne visons que le rôle attribué par M^{me} Girard-Mangin et V. Henri, dans l'agglutination des globules par les colloïdes, aux sels diffusés des hématies.

2. BREDIG, *Anorganische Fermente*.

les suspensions fines ne diffèrent les unes des autres que par la grosseur de leurs particules. Cette opinion est du reste partagée, en ce qui concerne les phénomènes dont il s'agit ici, par Landsteiner et Jagic¹, par M^{me} Girard-Mangin et V. Henri².

Faisons remarquer d'abord que les colloïdes étudiés par ces derniers auteurs sont très sensibles à l'action floculante des électrolytes; ils pourraient donc l'être aussi à celle des électrolytes endoglobulaires diffusés; mais il ne s'ensuit pas que ce soit nécessairement là qu'il faille chercher la cause de leur pouvoir agglutinant sur les globules.

Il n'est pas nécessaire en effet, pour que l'agglutination des globules par une poudre soit possible, que celle-ci soit sensible à l'action précipitante des sels diffusant des globules. En effet, nous avons constaté que BaSO_4 agglutine parfaitement les globules; or BaSO_4 est bien plus sensible à l'action de la pesanteur qu'à celle des électrolytes; même exposé à des concentrations salines très fortes, il n'est pas plus floculé que dans l'eau distillée, où il se sédimente assez vite.

Nous nous sommes proposé de rechercher si une poudre, capable d'être floculée par les électrolytes, peut encore, après floculation, agglutiner des globules. Nous avons employé CaFl^2 précipité d'un aspect assez colloïdal et qui est floculé même par NaCl 8 0/00. Or CaFl^2 , floculé au préalable par NaCl 8 0/00 ou 2 0/0, agglutine encore instantanément, et aussi bien que s'il était en émulsion dans l'eau distillée, les globules contenus dans l'eau physiologique à 6 0/00 par exemple. Toutefois si l'on augmente jusqu'à 3 0/0 la concentration saline du liquide contenant CaFl^2 , celui-ci n'agglutine plus aussi bien. Ce fait prouve simplement, à notre avis, que lorsqu'on a accumulé en amas très denses beaucoup de précipité colloïdal, ces amas sont moins actifs sur les globules; mais cela tient uniquement à ce que, dans ce cas, le mélange intime des globules et de CaFl^2 n'est plus possible. Quand, au contraire, les amas sont plus lâches (CaFl^2 dans NaCl à 8 0/00, à 2 0/0) et par conséquent plus dissociables, l'action de la poudre sur les globules n'est que très peu atténuée. Il ne faut pas forcément conclure de ces faits que l'agglutination des globules par CaFl^2 n'est

1. LANDSTEINER ET JAGIC, *Munch. med. Woch.*, n° 27, 1904.

2. M^{me} GIRARD-MANGIN ET V. HENRI, *Soc. de Biol.*, n° 19, 1904.

possible que si ce dernier se trouve dans un état de dissociation lui permettant d'être floculé près des globules par les sels endoglobulaires en voie de diffusion, mais simplement que plus le mélange de globules et de CaFl^2 est intime, plus l'agglutination est intense¹.

Si, comme le veulent M^{me} Girard-Mangin et V. Henri, les colloïdes sont floculés autour des globules avant de les agglutiner, cette floculation repose en somme sur une différence de concentration saline entre la zone périglobulaire riche en sels, car elle contient des sels endoglobulaires, et le liquide interglobulaire, plus pauvre. Si cette différence était supprimée, il n'y aurait plus de raison pour que les colloïdes soient floculés de préférence autour des globules, et conséquemment l'agglutination de ces derniers par les colloïdes devrait être nulle ou tout au moins diminuée. Nous avons recherché si cette conséquence est vérifiée par l'expérience. Introduisons dans un grand volume d'eau physiologique une certaine quantité de globules rouges bien lavés; laissons-les dans ce liquide pendant 3 ou 4 heures, en ayant soin de les agiter de temps à autre. Il va de soi que plus la diffusion des sels endoglobulaires se prolonge, plus la teneur saline du liquide interglobulaire se relève, et plus l'équilibre entre ce dernier et la zone périglobulaire se réalise. D'autre part, les globules perdant de plus en plus leurs électrolytes, leur teneur saline se rapproche progressivement de la concentration du liquide où ils baignent. Au bout d'un certain temps, par conséquent, un équilibre salin se sera fait entre les globules et le liquide. Centrifugeons à ce moment et décançons le liquide surnageant; nous avons ainsi un liquide A (eau physiologique + sels endoglobulaires diffusés) et des globules D, déchargés de ces sels.

Introduisons dans un tube (tube 1) un volume déterminé de liquide A, et dans un autre tube (tube 2) une quantité égale d'eau

1. Il est probable qu'il en est de même pour les solutions colloïdales, qui seront évidemment d'autant moins actives qu'elles seront davantage floculées par les électrolytes. M^{me} Girard-Mangin et V. Henri prétendent que les colloïdes floculés n'agglutinent plus les globules; au contraire, Landsteiner et Jagic trouvent que cette floculation préalable des colloïdes ne diminue pas leur pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules. Il est possible que tous ces expérimentateurs aient raison, que l'on puisse floculer les colloïdes à des stades divers et obtenir des colloïdes floculés agglutinants ou non agglutinants, suivant que les électrolytes ont formé des flocons lâches ou denses, c'est-à-dire suivant que le mélange des colloïdes et des globules est encore possible.

physiologique; ajoutons à tous deux la même dose de CaFl^2 et laissons au repos pendant 1/2 heure; les sels endoglobulaires contenus dans le liquide A auront ainsi le temps d'agir sur la poudre. Ajoutons ensuite à chacun de ces tubes la même quantité de globules D (déchargés de leurs sels). Aussitôt l'agglutination des globules se produit. Il n'y a pas de différence dans l'intensité de l'agglutination que présentent les deux tubes, et cependant les conditions expérimentales sont loin d'être identiques dans les deux cas. En effet, comme on peut le remarquer, nous nous sommes servi de globules D et non de globules neufs. Nous avons agi de la sorte parce que ces globules D ont été auparavant en contact pendant longtemps avec le liquide A; les teneurs salines des globules et de ce liquide A ont donc été sensiblement égalisées, de sorte que les globules D remis dans le tube 1 où se trouve du liquide A. n'auront plus rien à céder à ce liquide; dans celui-ci la zone périglobulaire ne sera donc pas plus riche en sels que le liquide interglobulaire. Au contraire, dans le tube 2, les globules D rencontrent de l'eau physiologique sans sels endoglobulaires; leur teneur saline est donc plus élevée que celle de cette eau. Aussi vont-ils laisser diffuser leurs sels et créer ainsi une zone périglobulaire plus salée que le liquide interglobulaire. En somme, dans le tube 1, zone périglobulaire et liquide interglobulaire de même concentration; dans le tube 2, zone périglobulaire plus salée que le liquide interglobulaire. L'agglutination des globules par CaFl^2 devrait donc être plus intense dans le tube 2 que dans le tube 1, si les sels de la zone périglobulaire jouaient un rôle dans ce phénomène.

Et dans cette hypothèse, il y aurait dans notre expérience encore une seconde raison, pour que l'intensité de l'agglutination soit différente dans les tubes. En effet, puisque nous avons introduit CaFl^2 longtemps avant les globules, cette poudre sera soumise à l'action floculante de l'eau physiologique dans le tube 2 et à celle du liquide A dans le tube 1. Or ce liquide A, contenant des sels endoglobulaires, devrait être plus floculant que l'eau physiologique; par conséquent CaFl^2 , plus floculé dans le tube 1 que dans le tube 2, devrait y être moins actif sur les globules. Or, comme nous l'avons vu, les choses ne se passent pas ainsi; au surplus, CaFl^2 n'est pas floculé davan-

tage dans le tube 1 que dans le tube 2; s'il est sensible, ainsi que nous l'avons dit, à l'eau physiologique, le surcroît salin du tube 1, dû aux sels endoglobulaires, n'occasionne pas une floculation plus intense de la poudre.

Cette expérience montre donc que l'agglutination des globules par CaFl^2 ne perd pas de son intensité, si, par des manipulations appropriées, on ramène à un minimum, l'influence floculante que pourrait avoir sur cette poudre la zone périglobulaire, riche en sels endoglobulaires diffusés, ce qui tend à enlever à cette zone toute intervention dans l'agglutination des hématies par les poudres.

On pourrait cependant nous objecter que dans de telles expériences, on ne pousse jamais assez loin la diffusion des sels endoglobulaires et que la concentration saline de la zone périglobulaire est toujours suffisante pour déterminer la précipitation du colloïde ou de la poudre autour des globules. Nous avons signalé dans notre première note un fait qui répond à cette objection : faisons sortir des globules tout ce qu'ils sont susceptibles d'abandonner. Dans ce but, laquons ces globules par l'eau distillée; puis lavons-les plusieurs fois à l'eau salée à 7 0/00; nous estimons qu'après quelques lavages, la teneur saline dans le stroma, et par suite dans la zone périglobulaire, ne peut plus dépasser celle du liquide interglobulaire; nous n'avons donc plus à tenir compte, dans toutes les parties de l'émulsion de stromas, que du NaCl de l'eau physiologique. Puisqu'il n'y a plus de sels endoglobulaires qui diffusent des stromas, ceux-ci ne devraient pas être agglutinables par un colloïde ou une poudre. Or, si à ces stromas on ajoute un peu de CaFl^2 , on observe une agglutination absolument comparable à celle des globules rouges; il en est de même si on remplace CaFl^2 par Ba So^4 ou l'hydrate ferrique colloïdal.

Nous ne croyons pas qu'il y ait lieu d'admettre pour l'agglutination des stromas et pour celle des globules rouges par les colloïdes et les poudres des explications différentes. Tout ce qu'on observe, en effet, dans l'agglutination des globules par une poudre, par CaFl^2 par exemple, on le retrouve dans l'agglutination des stromas provenant de ces globules, par la même poudre. Ainsi, dans les deux cas, l'intensité de l'agglutination dépend de la quantité de fluorure employée; le maximum se

produit avec une dose optimale, en dessous et au-dessus de laquelle l'agglutination diminue. Dans les deux cas aussi, l'addition d'une faible quantité de sérum empêche l'agglutination. Les deux phénomènes sont donc absolument superposables, ce qui, à notre avis, montre à l'évidence que dans l'agglutination des globules par les poudres, les sels endoglobulaires diffusés n'ont pas à flocculer ces poudres, pour que l'agglutination se fasse; l'action fondamentale se passe entre les éléments albuminoïdes (stromas) des globules, et les poudres ¹.

A vrai dire, il est une conséquence de la théorie de M^{me} Girard-Mangin et V. Henri qui semble vérifiée par l'expérience; mais ce n'est là, comme nous allons le voir, qu'une apparence, le phénomène dont nous voulons parler devant recevoir une explication différente de celle qui lui reviendrait de par cette théorie. Voici ce dont il s'agit: si les sels endoglobulaires intervenaient en flocculant les colloïdes et les poudres autour des globules, on devrait, en extrayant ces sels des globules par le laquage, obtenir un liquide L qui, débarrassé de stromas par la centrifugation, empêcherait l'agglutination de nouveaux globules par une poudre; il devrait surtout en être ainsi, si dans ce liquide L on introduit la poudre avant les nouveaux globules, ce qui lui permettrait d'être flocculée par les sels endoglobulaires contenus dans le liquide. Laquons donc des globules dans l'eau distillée; ajoutons ensuite assez de NaCl pour y ramener la teneur saline de l'eau physiologique à 70/00 et éloignons les stromas par la centrifugation; puis décantons le liquide surnageant qui s'est chargé de tout ce qui peut diffuser des globules. Introduisons dans un volume déterminé de ce liquide, des quantités connues de CaF_2 , de BaSO_4 ou d'hydrate ferrique colloïdal, et après un certain temps additionnons tous ces mélanges d'une petite dose de globules neufs lavés. Nulle part il n'y a agglutination. Le liquide où l'on a laqué des globules, privé de

1. Notons, en effet, que l'agglutination des stromas peut être obtenue par BaSO_4 contenu soit dans de l'eau distillée, soit dans de l'eau chlorurée même à 20/0, il nous paraît difficile d'admettre que cette poudre, si insensible aux électrolytes, soit influencée par les traces de sels qui pourraient encore diffuser des stromas.

M^{me} Girard-Mangin et V. Henri ont observé des phénomènes analogues dans l'agglutination des globules par les colloïdes; les stromas sont aussi agglutinés par ces derniers. Aussi pensons-nous qu'il n'y a pas lieu d'admettre dans ce cas non plus le rôle actif que ces auteurs attribuent aux sels endoglobulaires.

stromas, empêche donc complètement l'agglutination de nouveaux globules par les poudres ou par l'hydrate ferrique.

Ce fait, qui cadre si bien à première vue avec les idées de M^{me} Girard-Mangin et V. Henri, ne peut cependant s'expliquer, pensons-nous, par la théorie émise par ces auteurs. Si, en effet, le pouvoir empêchant de ce liquide était dû à des sels endoglobulaires diffusés, il devrait résulter de la précipitation des colloïdes et des poudres par ces sels; cette précipitation survenant dans ce cas en l'absence de globules introduits dans la suite. Or, on n'observe pas cette précipitation des colloïdes ou des poudres dans le liquide de laquage; c'est précisément l'inverse que l'on constate. Tandis que l'eau physiologique floccule assez rapidement CaFl^2 , l'hydrate ferrique et laisse BaSO^4 se sédimenter assez vite, le liquide L, dépouillé de stromas, maintient assez longtemps ces poudres en suspension et même l'hydrate ferrique si sensible cependant aux sels. Les électrolytes de ce liquide ne pouvant avoir qu'une action flocculante, ne sont évidemment pas responsables de cette suspension ¹.

Nous croyons (bien que cette opinion ne repose pas sur une démonstration expérimentale irréfutable) que si l'hydrate ferrique et CaFl^2 ne sont pas précipités par les électrolytes du liquide L et que si BaSO^4 reste dans ce dernier finement dissocié, cela tient à ce qu'ils sont maintenus en émulsion par des colloïdes, probablement albuminoïdes, sortis des globules lors du laquage. Il s'agirait d'un phénomène identique à l'action dissociante du sérum sur BaSO^4 , action que nous avons signalée antérieurement et sur laquelle nous allons revenir tantôt. Ce pouvoir dissociant est épuisable, comme le pouvoir dissociant du sérum; si nous voulons l'attribuer à une substance, nous dirons que cette substance peut être enlevée au liquide de laquage. Pour le prouver, introduisons une quantité un peu forte de CaFl^2 dans ce liquide L sans stromas; puis, après un contact d'une quinzaine de minutes, éloignons CaFl^2 par la centrifugation. Nous obtenons alors, par décantation, un liquide A qui ne diffère du liquide initial de laquage L que par le fait d'avoir subi l'action d'une forte dose

1. Neisser et Friedmann* ont vu, il est vrai, que des colloïdes, flocculés par des doses déterminées de sels, ne le sont plus si l'on exagère la quantité de sel, mais il s'agit dans leurs expériences de sels de métaux lourds, et ils ont pu rapporter ce fait à la formation d'hydrate colloïdal par l'hydrolyse de ces électrolytes. Ce n'est évidemment pas le cas pour les sels qui diffusent des globules rouges.

* NEISSER ET FRIEDMANN, *Münch. med. Woch.*, 1904, n° 11.

de fluorure. Or, tandis que, comme nous venons de le voir, la floculation de CaFl^2 et de l'hydrate ferrique, la sédimentation de BaSO^4 introduits dans le liquide L, sont empêchées, cette floculation et cette sédimentation se produisent très bien dans le liquide A. De plus, alors que l'agglutination des globules neufs par les poudres et par l'hydrate ferrique ne se fait pas dans le liquide L, elle se fait parfaitement dans le liquide A.

Quelque chose a donc été enlevé du liquide L par la forte dose de CaFl^2 , quelque chose qui empêchait d'une part la floculation de CaFl^2 , de l'hydrate ferrique par les électrolytes ainsi que la sédimentation de BaSO^4 ; d'autre part, l'agglutination des globules par ces trois corps. Nous croyons que ces substances (ou cette substance?) sont des colloïdes albuminoïdes sortis des globules lors du laquage; nous basons cette hypothèse sur les résultats que nous a donné l'étude de l'action empêchante du sérum (albuminoïdes colloïdaux) sur l'agglutination des globules par les poudres¹.

Une fois ces colloïdes enlevés, on a donc un liquide (liquide A) où la floculation de CaFl^2 et de l'hydrate ferrique par les sels endoglobulaires diffusés lors du laquage peut se faire, et en effet, ces substances floclent. Mais cela ne les empêche nullement d'agglutiner les globules que l'on ajoute ensuite. Ces expériences montrent, à notre sens, que les sels endoglobulaires, extraits par le laquage, ne s'opposent pas à l'agglutination de globules neufs par les poudres ou les colloïdes; nous avons vu tantôt que d'autre part les stromas, privés de sels endoglobulaires sont, tout autant que les globules, agglutinables par les colloïdes et les poudres.

En résumé il ressort de tout ceci qu'en ce qui concerne les poudres que nous avons employées, il n'est pas nécessaire, pour expliquer leur action agglutinante sur les globules, de supposer une floculation de ces poudres par les sels endoglobulaires diffusés de ces globules. Nous avons vu, en effet : 1° que cette agglutination est encore possible par les poudres floclées au préalable par les électrolytes; 2° qu'il en est de même si l'on ramène au minimum la surcharge saline de la zone périglobulaire des hématies, de façon à annihiler

1. Nous avons, en effet, signalé dans notre première note — nous nous bornerons en ce moment à rappeler le fait — que si le sérum empêche l'action agglutinante des poudres sur les globules, on peut lui enlever ce pouvoir empêchant en le traitant au préalable par une forte dose de CaFl^2 ou de BaSO^4 .

l'action flocculante hypothétique de cette zone sur les poudres ; 3° que les phénomènes d'agglutination des stromas et des globules par les poudres sont identiques ; 4° que la sensibilité de celles-ci à l'action flocculante des sels n'est pas une condition sine qua non de leur pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules BaSO_4 . Toutes les particularités de l'agglutination des globules par les poudres s'observant aussi si on remplace ces dernières par des colloïdes, nous pensons que, si ceux-ci sont réellement flocculés par les sels endoglobulaires diffusés, ce n'est pas là la cause de leur pouvoir agglutinant sur les hématies.

Nous nous sommes du reste efforcé de démontrer ce fait d'une façon plus directe ; nous avons recherché si l'on n'obtiendrait pas des phénomènes d'agglutination analogues à ceux que nous avons rapportés jusqu'ici en faisant agir nos poudres non sur des globules rouges, mais sur une émulsion dont les particules ne contiendraient pas de sels et ne pourraient par conséquent en laisser diffuser. Nous avons employé à cette fin des émulsions d'huile dans l'eau, que nous avons préparées en ajoutant 5 gouttes d'huile d'olive à 10 c. c. d'eau distillée, additionnée de 1/10,000 de carbonate de soude. Ces émulsions, à peine alcalines, peuvent être d'ailleurs neutralisées et même acidifiées, sans présenter aucune modification. Nos expériences ont été faites avec des émulsions neutralisées aussi exactement que possible. Dans ces conditions, on voit les gouttelettes d'huile de l'émulsion et les poudres qu'on y ajoute (CaF_2 , BaSO_4) s'agglutiner réciproquement en gros amas ; il en est de même si l'on fait agir sur ces émulsions d'huile l'hydrate ferrique colloïdal. Tous les flocons ainsi obtenus se montrent, au microscope, formés de la poudre ou de l'hydrate, et parsemés de gouttelettes d'huile. De même que nous l'avons observé dans l'agglutination des globules rouges par les précipités chimiques, l'addition d'une quantité très faible de sérum empêche complètement l'agglutination des globules d'huile par les poudres et l'hydrate ferrique.

Etant donnée l'analogie complète que présente l'agglutination des globules rouges et des globules d'huile par les précipités chimiques et par l'hydrate ferrique, nous pensons que le phénomène relève dans les deux cas des mêmes causes, et que l'agglutination des hématies par les poudres et les colloïdes

n'est pas une conséquence indirecte de l'action d'électrolytes sur ces derniers, mais qu'elle a pour point de départ une action directe de ces éléments les uns sur les autres.

*
* *

Nous venons de voir que certaines poudres (CaFl^2 , BaSO^4), agglutinent les globules; remplaçons maintenant les globules par du sérum et mettons ces deux poudres en contact de petites quantités de ce dernier: CaFl^2 , est agglutiné tandis que BaSO^4 se comporte d'une façon absolument différente. Introduit dans de l'eau physiologique, BaSO^4 subit très bien l'action de la pesanteur et descend assez rapidement au fond du tube; dans du sérum, au contraire, il ne descend plus ou ne se sédimente que très lentement; il reste dans le liquide à un état de division extrêmement fine. Cette action dissociante du sérum sur BaSO^4 est très marquée; elle est, en effet, encore visible, si nous ajoutons à 1 c. c., par exemple, d'eau physiologique à 8 0/00, contenant 4 gouttes de notre émulsion de BaSO^4 , 1 goutte de sérum dilué au 1/20.

Il y a donc, d'un côté, agglutination (BaSO^4 et globules), de l'autre un phénomène tout à fait différent, une dissociation de la poudre (BaSO^4 et sérum). Or on admet généralement que les albuminoïdes du sérum sont en solution colloïdale. L'émulsion de globules et le sérum sont donc tous deux des émulsions d'albuminoïdes, dont les particules sont volumineuses dans la première, extrêmement petites dans la seconde. De plus, toutes deux ont la même charge électrique, négative¹. Comment se fait-il, dès lors, que l'addition d'une même substance BaSO^4 , à deux émulsions si comparables (globules et sérum), donne lieu à des phénomènes d'aspect aussi opposé? Agglutination et dissociation semblent en effet le contraire l'une de l'autre; mais sont-elles réellement aussi opposées qu'elles le paraissent à première vue? Ne sont-elles pas simplement deux conséquences très différentes d'un seul et même phénomène fondamental, dont l'aboutissant nous apparaîtrait, suivant les cas, être une agglutination ou une dissociation?

1. N'oublions pas cependant que si, pour M^{me} Girard-Mangin et V. Henri*, le sérum peut être considéré comme un colloïde négatif, d'autres auteurs, notamment Neisser et Friedemann**, se basant sur les travaux de Hardy, font à ce sujet leurs réserves.

* M^{me} GIRARD-MANGIN et V. HENRI, *Soc. de Biol.*, 1904, n° 24.

** NEISSER et FRIEDMANN, *l. c.*

Lorsque nous voyons les globules et BaSO^4 s'agglutiner, il nous faut bien admettre une adhésion entre la poudre et les globules. Lorsque au lieu de globules on emploie du sérum et que BaSO^4 est dissocié par celui-ci, une adhésion ne se produirait-elle pas aussi entre la poudre et les particules albuminoïdes du sérum ? Des lors, le phénomène fondamental serait une adhésion de la poudre avec les globules, d'une part, avec les albuminoïdes du sérum, de l'autre ; mais cette adhésion serait suivie tantôt d'une agglutination des deux éléments (BaSO^4 et globules), tantôt d'une dissociation de la poudre (BaSO^4 et sérum).

Voici les expériences que nous avons établies pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse :

1^{re} Expérience. — Si une adhésion existe entre les particules albuminoïdes du sérum et BaSO^4 , le pouvoir dissociant du sérum vis-à-vis de cette poudre, doit avoir une limite. Pour nous en assurer, nous allons faire agir sur une petite quantité de sérum, une forte dose de BaSO^4 . Centrifugeons d'abord 5 tubes contenant chacun 2 c. c. de notre émulsion de sulfate, puis rejetons les liquides surnageants. Délayons ensuite l'un des culots ainsi obtenus dans le sérum à expérimenter (5/10 c. c. de sérum frais de cheval dilué avec 4,5 c. c. d'eau physiologique). Après quelques minutes de contact, centrifugeons et délayons de même, dans le liquide décanté de ce premier tube, le deuxième culot ; puis passons au troisième, et ainsi de suite. Après cela, faisons agir le sérum ainsi traité sur une petite dose de BaSO^4 ; nous constatons qu'il n'a plus aucune action dissociante sur cette poudre ou une action infiniment plus faible que le sérum dilué d'où nous sommes parti. De même il n'agglutine plus CaFl^2 et n'empêche plus l'agglutination des globules ni par CaFl^2 , ni par BaSO^4 . La solution colloïdale que constitue le sérum perd donc ses substances albuminoïdes par son contact avec de fortes doses de BaSO^4 , tout comme une émulsion de globules rouges, qui agglutine le sulfate, perd ses globules.

2^e Expérience. — Si la comparaison est juste, nous devons admettre qu'au BaSO^4 mélangé à du sérum, adhérent les colloïdes du sérum qui le maintiennent dissocié, comme les globules s'unissent au sulfate pour former des amas. Si on lave à plusieurs reprises dans l'eau physiologique ces amas qui sont le résultat de l'adhésion des globules et de la poudre, ils persistent, c'est-

à-dire que l'union des deux éléments se conserve. Si nous lavons de même du sulfate de baryum qui a été au contact de sérum, restera-t-il dissocié, c'est-à-dire l'adhésion de la poudre aux colloïdes dissociants du sérum persistera-t-elle?

Une certaine quantité de BaSO_4 (12 gouttes de notre émulsion) est mélangée à une forte dose de sérum de cheval (3 c. c. de sérum frais dilué au $1/4$) ; on centrifuge après 15 minutes environ. Le culot est ensuite lavé dans l'eau physiologique jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus trace de sérum libre, ce dont on est certain quand ces eaux, portées à l'ébullition, ne blanchissent pas, ou encore quand elles ne dissocient plus du nouveau sulfate. Or si, à ce moment, nous reportons dans de l'eau physiologique le sulfate qui a été au contact du sérum, il reste émulsionné. Nous avons obtenu de la sorte une émulsion différant complètement du BaSO_4 neuf contenu dans l'eau physiologique ; cette émulsion, d'un aspect très colloïdale, ressemble à du lait ; elle finit toutefois par se clarifier, mais sans qu'il paraisse y avoir une agglutination de ses particules, car une légère secousse remet le tout en parfaite émulsion.

Cette expérience est la contre-partie de la précédente : le sérum doit son pouvoir dissociant à des substances colloïdales qui adhèrent au BaSO_4 , tout comme les globules s'accollent à cette poudre.

3^e *Expérience*. — Nous avons cherché à démontrer d'une façon plus directe l'union qui s'établit entre les colloïdes du sérum et les poudres que ce sérum dissocie. Comme on va le voir, nous avons pu remettre en liberté ces colloïdes, les séparer de la poudre à laquelle ils s'étaient attachés. Pour cela, il était nécessaire de pouvoir éliminer cette poudre, par exemple en la dissolvant ; nous nous sommes servi à cet effet non du BaSO_4 difficile à dissoudre, mais de phosphate tricalcique en émulsion dans l'eau distillée. De même que BaSO_4 , le phosphate tricalcique, qui se sédimente assez rapidement dans l'eau physiologique et dans l'eau distillée, reste longtemps en émulsion en présence de sérum de cheval : 3 gouttes de notre émulsion, par exemple, restent longtemps dissociées dans 1 c. c. de sérum frais dilué au $1/10$. Saturons donc de sérum (4 c. c. de sérum dilué au $1/4$ par de l'eau physiologique) une dose assez considérable de phosphate tricalcique (20 gouttes de notre émulsion), puis

après $1/4$ d'heure de contact centrifugeons le précipité et lavons-le à maintes reprises à l'eau physiologique, jusqu'à ce que cette dernière ne contienne plus de sérum libre, ce que l'on vérifie comme dans l'expérience précédente. Le phosphate est ensuite remis dans un volume d'eau physiologique égal à celui du sérum avec lequel il avait été en contact. Nous obtenons ainsi une émulsion homogène, comme dans le cas du sulfate de baryum imprégné de sérum.

Introduisons dans un tube (t. 1) 1 c. c. de cette émulsion (phosphate-sérum); dans un tube 2 une quantité correspondante de phosphate neuf; diluée dans 1 c. c. d'eau physiologique, dans un tube 3, une très faible quantité (0,025 c. c.) de sérum et 1 c. c. d'eau physiologique. Ajoutons ensuite à chacun de ces 3 tubes, 1 goutte d'acide acétique. Le tube 3 ne présente aucune modification; dans les tubes 1 et 2, une certaine quantité de phosphate se dissout, le reste demeurant en suspension. Après $1/4$ d'heure, centrifugeons ces deux tubes, puis décantons les liquides obtenus. Ces liquides ne diffèrent entre eux que par ceci: l'un provient de la dissolution de phosphate neuf (t. 2), l'autre de la dissolution du même phosphate imprégné au préalable des substances dissociantes du sérum (t. 1). Si, comme nous le disions tantôt par la dissolution du phosphate auquel elles étaient fixées, nous avons remis ces substances en liberté, elles doivent être présentes dans le liquide du tube 1, de sorte que si nous introduisons à présent du sulfate de baryum, elles devront le dissocier comme le ferait du sérum. C'est, en effet, ce que l'on observe: ajoutons à ces deux liquides, ainsi qu'au tube 3, 4 gouttes de BaSO_4 ; il se sédimente rapidement dans le tube 2 (dissolution du phosphate neuf), tandis qu'il reste dissocié dans le tube 1 (phosphate-sérum redissous), ainsi que dans le tube 3. Des tubes témoins montrent que ni les eaux de lavage ni l'acide acétique n'ont la moindre action dissociante sur BaSO_4 . On peut donc, en choisissant une poudre susceptible d'être dissociée par le sérum et facile à solubiliser, défaire la combinaison qui s'établit entre elle et les substances colloïdales du sérum qui la dissocient ¹.

1. Notons que si, au lieu d'acide acétique, on emploie HCl, qui dissout la totalité du phosphate, on constate que BaSO_4 n'est pas maintenu dissocié dans le liquide provenant de la dissolution du phosphate imprégné de sérum; mais il faut remarquer qu' BaSO_4 se sédimente aussi dans du sérum additionné de la même quantité de HCl. Cela tient donc simplement à ce que HCl empêche l'action dissociante du sérum.

Ces expériences montrent, nous semble-t-il, que tout au moins dans les cas qui nous ont occupé, les phénomènes d'agglutination (globules BaSO_4) et de dissociation (sérum BaSO_4), d'aspect si différent ont cependant pour point de départ le même fait : l'affinité de la poudre pour les globules et les colloïdes du sérum. Quelle est la cause qui, dans des cas aussi voisins, détermine des phénomènes aussi opposés ? Nous n'essayerons pas de donner une raison définitive de cette dissemblance ; nous nous contenterons d'émettre une hypothèse ; nous avons du reste cherché à l'étayer par quelques faits. Puisqu'il est acquis qu'une adhésion se produit dans ces deux cas entre la poudre et les particules qui constituent soit l'émulsion de globules rouges, soit le sérum, on peut se demander si, lorsque les combinaisons dues à cette adhésion se sont produites, les propriétés respectives des éléments employés n'influencent pas la tournure que prend la réaction. BaSO_4 , comme on le sait, ne demande qu'à se déposer, étant très sensible à l'action de la pesanteur. Or on le met en présence, d'un côté, de globules, c'est-à-dire de particules qui, elles aussi, se sédimentent, qui ne restent pas aisément en suspension ; nous pouvons supposer que la tendance de BaSO_4 à se sédimenter n'étant que médiocrement neutralisée par une tendance contraire des globules, l'influence du sulfate va prédominer et la combinaison BaSO_4 -globules descendre rapidement au fond du tube. Au contraire quand on met BaSO_4 en présence de sérum, il rencontre les colloïdes de ce dernier, colloïdes extrêmement difficiles à précipiter ; la tendance de BaSO_4 à se sédimenter sera donc ici contrebalancée par une influence opposée très prononcée ; si celle-ci prévaut, la combinaison BaSO_4 , ne se sédimentera pas, mais restera dissociée dans le liquide ; c'est ce qu'on observe, ainsi qu'il a été dit plus haut.

Dans cette hypothèse, ce serait de l'issue d'une lutte d'influences opposées que dépendrait l'apparition de la dissociation de BaSO_4 par le sérum. S'il en est ainsi, nous pouvons chercher à modifier le résultat de cette lutte, en affaiblissant l'une ou l'autre de ces influences ; c'est ce que nous nous sommes efforcé de réaliser.

On sait que lorsqu'on le chauffe à 60° — 65° le sérum passe par une série d'états transitoires dont l'aboutissant est la

coagulation en bloc. On peut éviter ce bloc en diluant au préalable le sérum; alors les albuminoïdes du sérum se coagulent encore par le chauffage, — plus ou moins complètement suivant le degré de dilution, — mais sans se prendre en masse. En laissant un quart d'heure, par exemple, dans l'eau bouillante, du sérum de cheval additionné de 3 fois son volume d'eau physiologique, on obtient un liquide blanchâtre où les albuminoïdes sont, tout au moins en grande partie, coagulées, sans former bloc; ce liquide est encore une véritable solution colloïdale; mais comparé à du sérum non chauffé, il représente une solution colloïdale dont les particules ont plus de tendance à s'agglomérer et à se sédimenter.

Préparons deux tubes, contenant la même quantité de BaSO_4 , dans le même volume d'eau physiologique, puis ajoutons, à l'un d'eux, une dose déterminée de sérum dilué au $\frac{1}{4}$ dans l'eau physiologique, non chauffé, et à l'autre un volume identique du même sérum dilué, mais porté au préalable $\frac{1}{4}$ d'heure dans l'eau bouillante. BaSO_4 , reste finement dissocié dans le premier tube, tandis qu'il forme dans le second des blocs, que l'on ne peut confondre avec la sédimentation spontanée de cette poudre dans l'eau physiologique sans sérum. Une fois cette agglutination faite et les amas déposés, on constate que l'aspect lactescent du liquide surnageant a diminué et, si on y ajoute une nouvelle dose de BaSO_4 , on observe que corrélativement à cet éclaircissement du liquide, son pouvoir agglutinant a baissé. Quand BaSO_4 est agglutiné par le sérum chauffé, il y a donc soudure entre cette poudre et les substances colloïdales, auxquelles le sérum chauffé doit son aspect laiteux. Puisqu'il en est ainsi, on peut enlever à du sérum chauffé son pouvoir agglutinant, en le faisant agir sur des quantités suffisamment fortes de BaSO_4 . En effet, amassons par centrifugation, au fond d'un tube, le sulfate contenu dans 4 c. c. de notre émulsion et rejetons le liquide surnageant; puis délayons le culot dans un mélange contenant 0,6 c. c. de sérum de cheval et 1,8 c. c. d'eau physiologique (mélange porté au préalable pendant 15 minutes dans l'eau bouillante); après quelques minutes, centrifugeons à nouveau.

Le liquide surnageant est absolument limpide, sans action sur du nouveau BaSO_4 , et ne blanchit plus à 100° , même

si on le laisse pendant une heure à cette température.

En résumé, nous avons vu que la dissociation du BaSO_4 par le sérum, et l'agglutination de cette poudre par les globules rouges ont comme point de départ le même phénomène : l'adhésion du sulfate des particules qui constituent le sérum et l'émulsion de globules. Nous avons émis l'hypothèse que le sort de la combinaison ainsi formée dépendait de l'intensité de la tendance à rester en suspension des particules unies au BaSO_4 , et qu'en diminuant cette tendance nous parviendrions peut-être à rendre prépondérante l'influence de la poudre et à provoquer ainsi une agglutination là où nous avons une dissociation. L'expérience, comme nous venons de le voir, appuie cette supposition ¹.

1. Nous rencontrons évidemment ici deux objections, qu'il nous paraît utile de combattre avant de nous avancer plus loin. On pourrait en effet penser que les substances qui provoquent l'agglutination ou la dissociation de BaSO_4 suivant que le sérum a été chauffé ou non, ne sont pas les mêmes; et on pourrait croire que le chauffage a simplement fait apparaître le pouvoir agglutinant du sérum en détruisant les substances dissociantes de ce dernier. Il ne paraît pas en être ainsi. En effet, si on traite une certaine quantité de sérum frais dilué (5/10 c. c. + 1,5 c. c. d'eau physiologique) par de fortes doses de BaSO_4 , on enlève, ainsi que nous l'avons dit tantôt, les substances dissociantes du sérum. Si on porte à 100°, pendant 1/4 d'heure, le sérum dilué ainsi traité, en même temps qu'un autre tube contenant le même sérum, mais non traité par BaSO_4 , on voit ce dernier devenir absolument laiteux par coagulation des albuminoïdes, tandis que le premier ne blanchit pas ou à peine. Mis en contact d'une faible dose de BaSO_4 , il ne l'agglutine pas ou extrêmement peu. En enlevant au sérum frais, par de fortes doses de sulfate, les substances qui dissocient ce dernier, on lui enlève en même temps la possibilité de devenir, par le chauffage, agglutinant pour cette poudre, c'est là une forte présomption pour que ce soit aux mêmes substances que le sérum doit d'agir différemment sur BaSO_4 , suivant qu'il a été chauffé ou non.

On pourrait encore nous objecter que le pouvoir dissociant du sérum est conservé même après le chauffage de ce dernier, mais qu'il est masqué par les propriétés agglutinantes que développe le chauffage. Cela ne nous semble pas être exact. En effet, nous avons vu tantôt que l'on peut enlever au sérum chauffé ses propriétés agglutinantes en le traitant par de fortes doses de BaSO_4 , mais on peut remarquer, en examinant nos chiffres, que cet épuisement est bien plus facile que celui du pouvoir dissociant du même sérum, non chauffé. Ainsi, tandis que 4 c. c. de notre émulsion de sulfate suffisent pour enlever à 2,4 c. c. de sérum au 1/4, chauffé à 100°, toute propriété agglutinante pour cette poudre, 10 c. c. de la même émulsion ne font qu'appauvrir le pouvoir dissociant de 2 c. c. du même sérum au 1/4, non chauffé. On pourrait donc, si les propriétés agglutinante et dissociante du sérum appartenaient à des substances différentes, enlever la première par une quantité assez faible de BaSO_4 , tout en conservant la seconde. Traitons donc un volume déterminé de sérum chauffé par la quantité de sulfate justement suffisante pour enlever le trouble; nous lui enlevons de la sorte tout pouvoir agglutinant, mais il est aisé de constater qu'il n'a pas retrouvé trace de sa propriété dissociante.

Nous pouvons donc admettre que c'est bien aux mêmes substances, modifiables par la chaleur, que sont dues les deux actions opposées du sérum sur BaSO_4 .

S'il en est ainsi, l'agglutination de BaSO_4 et du sérum chauffé repose sur la diminution de l'état colloïdal de ce dernier, nous obtiendrons peut-être des phénomènes différents, suivant que nous mettrons en contact d'une même quantité de poudre tantôt une dose faible, tantôt une dose forte de sérum chauffé. Introduisons dans deux tubes des quantités identiques (4 gouttes de notre émulsion) de BaSO_4 , puis ajoutons à l'un d'eux 0,95 c. c. d'eau physiologique et 0,05 c. c. de sérum chauffé; à l'autre 0,6 c. c. d'eau physiologique et 0,4 c. c. du même sérum. Nous obtenons une belle agglomération dans le premier tube (peu de sérum), tandis que la poudre reste dissociée dans le second (beaucoup de sérum). Il a donc suffi de remédier à l'affaiblissement que le chauffage détermine dans le pouvoir dissociant du sérum, en employant une plus grande quantité de ce dernier, pour obtenir de nouveau la dissociation de la poudre.

Non seulement une forte dose de sérum chauffé peut dissocier du BaSO_4 neuf, mais elle peut remettre en suspension fine du sulfate préalablement agglutiné par une faible quantité du sérum. Préparons deux tubes contenant chacun 0,95 c. c. d'eau physiologique, 0,05 c. c. de sérum chauffé et 4 gouttes de notre émulsion de BaSO_4 ; quand l'agglutination est complète, ajoutons à l'un d'eux (tube 1) 0,35 c. c. du même sérum chauffé et à l'autre (t. 2), 0,35 c. c. d'eau physiologique. Agitons énergiquement les deux tubes; tandis que l'agglutination persiste dans le tube 2, la poudre est finement dissociée dans le tube 1; celui-ci présente absolument le même aspect qui si on eût fait agir d'emblée sur les 4 gouttes de BaSO_4 , 0,4 c. c. de sérum chauffé¹.

Quand le sérum a été chauffé 1/4 d'heure à 100°, après avoir été dilué dans 3 volumes d'eau physiologique, et qu'il est ainsi devenu opaque, il faut, pour obtenir la dissociation de BaSO_4 , employer une forte dose de sérum chauffé. Cependant on peut chauffer à 100° du sérum dilué et lui conserver intact, ou peu s'en faut, son pouvoir dissociant; si nous diluons en effet le sérum non plus avec 3 volumes d'eau physiologique, mais avec 3 volumes

1. Signalons la ressemblance que présente ce fait avec l'observation de Henri et Mayer, qui ont vu que des amas résultant de l'agglutination réciproque de deux colloïdes de signe électrique contraire se redissolvent dans un excès de l'un ou de l'autre de ces colloïdes*.

* HENRI ET MAYER, *Soc. de Biol.*, 1904, n° 19.

d'eau distillée, et si nous le chauffons $1/4$ d'heure à 100° , il conserve presque complètement son pouvoir dissociant des poudres. Mais hâtons-nous de faire remarquer que, tandis que le sérum dilué d'eau physiologique est fortement blanchi, le sérum dilué d'eau distillée l'est à peine, c'est-à-dire que les albuminoïdes du sérum n'ont été coagulés que très incomplètement. Cette modification des albuminoïdes est donc indispensable, pour que, les colloïdes perdant suffisamment de leur tendance à rester en solution, l'influence contraire du sulfate de baryte puisse prévaloir et provoquer la formation de grumeaux. Et en effet, si nous chauffons pendant $1/4$ d'heure du sérum dilué dans l'eau physiologique, à des températures variables : 55° , 70° , 85° , 100° , nous constatons que l'agglutination du BaSO_4 se fait par le sérum chauffé à 85° ou à 100° , tandis qu'il y a dissociation de la poudre quand la température ne s'est élevée qu'à 55° ou 70° . Or, le sérum chauffé à 70° n'a pas blanchi, tandis qu'à 85° le sérum dilué est devenu laiteux.

Tous ces faits montrent que lorsqu'on mélange BaSO_4 à du sérum, on obtient une agglutination des deux éléments ou une dissociation de la poudre par le sérum, suivant que l'état colloïdal de ce dernier est plus ou moins prononcé. Mais ces deux phénomènes, si différents, reposent sur le même fait : l'adhésion des colloïdes à la poudre, tout comme, dans un mélange de sulfate et de globules, ceux-ci se collent au sulfate. Les deux faits, d'aspect si contraire : agglutination des globules par les précipités chimiques, suspension de ces derniers dans le sérum, ont donc un point commun.

L'existence de cette adhésion du sérum avec les poudres, comme BaSO_4 , rend aisée, nous semble-t-il, l'explication du rôle empêchant que ce colloïde joue dans l'agglutination des globules par ces poudres. Cette adhésion résultant évidemment d'une affinité entre ces poudres (BaSO_4 , etc.) et le sérum, il nous suffit d'admettre que cette affinité est plus forte que celle qui cherche à unir globules et poudres. Ayant à choisir entre les globules et le sérum, les poudres optent pour le sérum.

Jusqu'ici nous avons simplement relaté les expériences que nous avons exécutées avec les poudres, les globules et le sérum, et indiqué les conclusions qui découlent des faits observés. Qu'il nous soit permis — bien que nous entrions peut-être ici dans le

domaine de l'hypothèse — de jeter un coup d'œil, en utilisant ce que nous avons appris au sujet des poudres, sur les phénomènes que l'on a constatés dans l'étude des substances colloïdales. V. Henri, Lalou, Mayer et Stodel¹ ont vu que si on mélange un colloïde, négatif par exemple, stable, c'est-à-dire peu impressionnable par les électrolytes, à un colloïde de même signe, instable, c'est-à-dire sensible aux sels, le mélange ne se précipite pas et devient même plus insensible aux électrolytes que ne l'est le colloïde instable. Quand les électrolytes parviennent à flocculer le mélange, le précipité obtenu contient les deux colloïdes. Malheureusement, ce fait ne nous renseigne pas sur les rapports qu'ont entre eux les deux colloïdes pendant qu'ils sont en solution. On est tenté d'admettre que si le colloïde stable protège le colloïde instable contre l'action des électrolytes, c'est parce qu'il y a adhésion entre leurs particules. Cette protection d'un colloïde instable par un colloïde stable ressemble évidemment à la protection que le sérum exerce sur BaSO_4 contre l'action de la pesanteur. Nous avons montré que cette protection, qui amène une suspension de la poudre, relève précisément d'une adhésion de la poudre aux colloïdes du sérum. Aussi pensons-nous qu'il ne serait pas déraisonnable d'admettre que dans les mélanges de même signe électrique, la protection de l'instable par le stable relève aussi d'une adhésion des particules de ces deux corps. Il y aurait donc là adhésion comme dans les mélanges de deux colloïdes de signes opposés, mais tandis que dans ce dernier cas il se produit une floculation, celle-ci manque dans les mélanges de colloïdes de même signe.

L'adhésion se ferait ainsi entre les colloïdes, sans tenir compte de leur charge électrique ; suivant les cas, il se produirait ou non une floculation ultérieure. Mais cette floculation n'apparaîtrait plus comme la démonstration indispensable de l'adhésion des deux colloïdes ; l'absence de floculation ne pourrait plus être interprétée comme l'indice certain d'une absence d'adhésion entre les colloïdes. La précipitation de ceux-ci serait due à des facteurs dont un certain nombre paraissent actuellement connus (électrolytes, charges électriques contraires).

L'existence d'une telle adhésion expliquerait aisément un phénomène observé par M^{me} Girard-Mangin et V. Henri et qui

1. HENRI, LALOU, MAYER, STADEL, *loc. cit.*

consiste dans l'obstacle apporté par de faibles quantités de sérum à l'agglutination des globules par les colloïdes, aussi bien négatifs que positifs¹. Le sérum étant considéré comme un colloïde négatif, on comprend facilement qu'il s'oppose à l'action des colloïdes positifs sur les globules; car il floccule ces colloïdes comme tout colloïde négatif floccule les colloïdes positifs et inversement. Mais cette explication, dans la pensée de M^{me} Girard-Mangin et V. Henri, ne peut s'appliquer au cas des colloïdes négatifs, puisqu'ils ne sont pas précipités par le sérum. Se basant sur l'interprétation qu'ils ont donnée de l'agglutination des globules rouges par les colloïdes, interprétation que nous avons examinée dans la première partie de ce travail, ces auteurs ont expliqué le rôle empêchant du sérum sur le pouvoir agglutinant des colloïdes négatifs, par l'obstacle qu'apporte tout colloïde stable (sérum) à la flocculation des colloïdes instables de même signe (négatif) par les électrolytes qui, dans le cas présent, sont les sels endoglobulaires diffusés des hématies.

Si l'hypothèse d'une adhésion entre les colloïdes stables (sérum) et instables de même signe, combinaison de même ordre que celle du sérum avec BaSO_4 , est exacte, il suffit, pour expliquer l'entrave qu'apporte le sérum à l'agglutination des globules par les colloïdes instables négatifs, d'admettre que l'affinité des colloïdes pour le sérum l'emporte sur leur affinité pour les globules. Ce serait donc toujours pour la même raison que le sérum empêche l'agglutination des globules rouges, et par les colloïdes positifs qu'il floccule, et par les colloïdes négatifs qu'il ne floccule pas, et par BaSO_4 qu'il dissocie.

CONCLUSIONS

1° Certains précipités chimiques agglutinent, puis hémolysent les globules rouges lavés;

2° Cette agglutination a pour origine une action directe des précipités sur les globules, et inversement;

3° Il est probable que le pouvoir agglutinant des colloïdes sur les globules, doit avoir aussi pour base une action directe de ces éléments les uns sur les autres;

4. C'est évidemment là un fait analogue à celui que nous avons nous-même relaté dans notre première note, à savoir que le sérum empêche l'agglutination et l'hémolyse des globules par les poudres.

4° Le sérum empêche, même à petites doses, l'agglutination et l'hémolyse des globules par les précipités ;

5° Le sérum frais maintient en suspension fine certains précipités, tels que le sulfate de baryum ;

6° Dans cette dissociation de BaSO_4 par le sérum, il y a adhésion à cette poudre, des colloïdes albuminoïdes du sérum ; cette dissociation de BaSO_4 par le sérum et l'agglutination de BaSO_4 par les globules ont donc un point initial commun : l'adhésion à la poudre de particules en suspension (globules, colloïdes du sérum). L'adhésion des albuminoïdes du sérum aux poudres qu'ils dissocient peut se démontrer notamment, soit par ce fait que les poudres qui ont été dissociées par du sérum, restent dissociées si on enlève tout excès de sérum, soit par cette circonstance que l'on peut, en employant des précipités convenables ($\text{Ca}^{+3}(\text{PO}_4)^{-4}$), remettre en liberté les substances colloïdales qui s'y étaient attachées et les maintenaient en suspension ;

7° Dans l'apparition d'une agglutination ou d'une dissociation du précipité, il semble que l'intensité avec laquelle les particules qui s'attachent à la poudre tendent à rester en suspension, joue un certain rôle ;

8° Il est possible que, dans un mélange de deux colloïdes de même signe électrique, dont l'un est stable, l'autre instable, la protection que le premier exerce sur le second contre l'action flocculante des électrolytes soit due à une adhésion réciproque des particules des colloïdes.

DE LA SYMBIOSE DU BACILLE TYPHIQUE AVEC D'AUTRES MICROBES

LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

PAR LE D^r J. ATLASOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

DE LA SYMBIOSE DU BACILLE D'EBERTH AVEC D'AUTRES MICROBES

Le but que nous nous sommes proposé était de trouver les microbes qui favorisent le développement du bacille typhique, dans l'espoir de reproduire, avec leur concours, chez les animaux, la fièvre typhoïde expérimentale.

Pour résoudre cette question, il a fallu déterminer d'abord dans quelles conditions le bacille typhique ne poussait plus ou ne poussait que très faiblement. Si nous pouvions trouver des microbes favorisants qui permettraient au bacille typhique de cultiver, même dans ces conditions défavorables, la solution du problème que nous étudions serait peut-être facilitée.

On sait que le bacille d'Eberth se développe mal dans des milieux acides; il a donc fallu préciser les limites de l'acidité qui commencent à être incompatibles avec la vie du bacille typhique.

Les milieux employés étaient la gélose et la gélatine; cette dernière, à cause de sa transparence, permet d'apprécier des détails des cultures, d'autant plus qu'elle ne se trouble pas comme la gélose, après l'addition d'acides.

Pour acidifier nos milieux, nous nous sommes adressé à la solution normale d'acide chlorhydrique (36^{gr},5 de HCL pour 1 litre d'eau).

En faisant pousser le bacille typhique dans des milieux dont la teneur en acide augmentait de plus en plus, nous avons

constaté que la culture ne se faisait plus, lorsque la teneur en acide était de 0,0121 HCL pour 10 c. c. de milieu, soit de 0,121 0/0.

Ceci établi, nous nous sommes mis à ensemer, dans des boîtes de Petri, simultanément le bacille typhique et différents autres microbes, tantôt en croix, tantôt en faisant des stries parallèles. Nous avons étudié de la sorte la symbiose du bacille d'Eberth avec les microbes suivants : *B. coli comm.*, *proteus vulgaris*, *staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. Friedländer*, *sarcina rosea*, *sarc. Palm.*, *sarcina flava*, *sarcina alba et torula*.

Sans entrer dans les détails de ces expériences, nous nous contenterons de formuler les conclusions auxquelles nous sommes arrivés.

1° Le *B. coli comm.* pousse bien avec le bacille typhique, mais souvent il empiète sur ce dernier; il donne encore des cultures dans des milieux dont l'acidité est de 0,1825 0/0 HCL et dans lesquels le bacille typhique ne se développe plus;

2° Nous avons constaté que la plupart des microbes cités plus haut n'avaient aucune influence quelconque sur la culture du bacille typhique;

3° Le bacille de Friedländer favorise un peu le développement du bacille typhique : a) ce dernier peut donner encore une culture, en présence du bacille de Friedländer, bien que le milieu ait atteint la limite d'acidité, soit 0,121 0/0; si celle-ci est dépassée, le bacille typhique cesse de cultiver, alors que le bacille de Friedländer continue à se développer, même dans un milieu contenant 0,1825 0/0 de HCL; b) lorsqu'on enseme ces deux microbes en croix, on voit que le bacille typhique abandonne la strie suivant laquelle il devait se développer, et suit celle du bacille de Friedländer dans ce dernier cas; il peut même pousser plus abondamment que lorsqu'il est seul;

4° L'action favorisante est surtout très nette pour la *torula rosea*. En présence de cette dernière, le bacille typhique supporte une acidité de 0,1825 0/0, parfois même de 0,243 0/0, soit double de celle qu'il est capable de tolérer étant seul. Le phénomène signalé pour le bacille de Friedländer est beaucoup plus prononcé dans le cas de la *torula*.

Nous avons étudié sous ce rapport plusieurs espèces de

torula, mises obligeamment à notre disposition par M. le D^r Binot de l'Institut Pasteur : T. Hansen, T. nigra, T. alba et T. rosea. Les meilleurs résultats de tous ont été obtenus avec la T. rosea ; vient ensuite T. alba, puis T. nigra ; T. Hansen exerce l'action la plus faible de toutes.

Les résultats de la symbiose deviennent manifestes après plusieurs jours, souvent après une semaine et plus.

Quel est le mécanisme de l'action favorisante de la *torula rosea* ? Est-ce le changement de la réaction du milieu, est-ce l'influence favorable de ses produits de sécrétion, est-ce le changement de la constitution du milieu de culture, est-ce, enfin, que le microbe favorisant sert de substance nutritive au bacille typhique ?

Dans l'impossibilité de résoudre ces questions, nous nous sommes proposé de voir seulement s'il ne s'agit pas ici d'un changement de réaction du milieu qui, d'acide, deviendrait alcalin.

Pour résoudre cette question, j'ai fait, sur le conseil de M. Metchnikoff, l'expérience suivante : profitant de ce que beaucoup de champignons transforment le milieu acide en milieu alcalin, j'aiensemencé sur de la gélose acide (0,146 0/0 — 0,1825 0/0 — 0,243 0/0 HCL) le bacille typhique en même temps que les champignons suivants : *Aspergillus oryzae*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium glaucum*. Ils ont tous donné des cultures sur gélose acide, sauf le *A. glaucus* qui ne pousse plus, quand l'acidité est de 0,1825 0/0 HCL. A partir du 5^e jour, on pouvait constater, par le bleuissement du tournesol, l'apparition de la réaction alcaline, mais malgré cela le bacille typhique ne se développait pas ; or, ce dernier,ensemencé avec la *torula rosea* dans ces mêmes milieux, a donné une culture sans même que la réaction des milieux fût devenue alcaline. Ce n'est donc pas dans le changement de la réaction du milieu qu'il faut chercher la cause de l'action favorisante de la *torula rosea* sur le bacille typhique. Le même fait a été, du reste, observé par M. Metchnikoff au sujet du vibrion cholérique (2).

Cette action de la *torula* joue-t-elle aussi un rôle, au point de vue clinique ou épidémiologique ? On sait que la *torula* est très répandue dans la nature (3) et (4). On la trouve très souvent dans l'estomac chez l'homme ; ainsi De Bary (5), sur 17 per-

sonnes examinées à Strasbourg, l'a trouvée dans 76 0/0 des cas; cette fréquence a été également constatée par Capitan et Moreau (6); Metchnikoff, en examinant le contenu stomacal chez l'homme, y trouvait plus souvent des *torula* que des sarcins (7). Une étude plus approfondie de cette question projettera peut-être une lumière sur la prédisposition de certaines personnes à la fièvre typhoïde, ainsi que sur d'autres problèmes d'ordre épidémiologique.

Nous passerons maintenant, aux expériences ayant trait à la fièvre typhoïde expérimentale chez les jeunes lapins.

Bien que l'agent de la fièvre typhoïde soit connu depuis plus de 20 ans, on est encore loin d'être fixé sur la possibilité de reproduire expérimentalement cette maladie. D'après certains auteurs, tels que Neufeld (8), Beumer et Peiper (9), Sirotnin (10), Ali-Cohen (11), Baumgarten (12) et d'autres, les lésions produites chez les animaux par l'injection du b. typhique ne sont pas spécifiques et peuvent être obtenues par n'importe quels autres bacilles, pourvu que l'on en injecte beaucoup. D'autres auteurs, qui ont cru pouvoir déterminer la fièvre typhoïde expérimentale chez les animaux, injectaient les bacilles typhiques sous la peau, dans le péritoine ou dans les veines, (Gilbert et Girod (13), Petruschky (14), Germano et Moreau (15), Pfeiffer et Kolle (16), Chantemesse et Widal (17), Sanarelli (18) et d'autres). Quel que soit du reste le mode d'injection, il est clair qu'il est très différent de celui qui s'observe chez l'homme. Le mode d'inoculation de choix est l'inoculation par la voie gastro-intestinale.

Il a été mis en usage seulement deux fois : d'abord, par Chantemesse et Ramond (19), puis, par Remlinger (20). Chantemesse et Ramond auraient obtenu des résultats positifs chez un macaque qu'ils avaient nourri avec un mélange de confitures et de bacilles typhiques, puis chez des lapins qu'ils avaient préalablement « humanisés » en leur injectant pendant 3 semaines du sérum humain et de l'urine. Les expériences de Remlinger sont plus simples. Ce savant a obtenu une affection mortelle chez les animaux, en leur donnant à manger des légumes souillés de cultures typhiques, après 2-3 jours de jeûne.

Rappelons ici les expériences de Metchnikoff sur le choléra. Après avoir démontré l'importance des microbes favorisants et

empêchants sur la culture du vibrion cholérique, il pensa que si l'on ne réussit pas à reproduire le choléra chez les animaux de laboratoire, en introduisant des vibrions dans leur tube digestif, cela devrait tenir à ce que les vibrions y rencontrent des microbes exerçant une action antagoniste. L'asepsie de l'appareil gastro-intestinal étant très difficile à réaliser, comme cela ressort des recherches de Stern (21) et comme cela a été plus tard confirmé par Strasburger (22) et d'autres, Metchnikoff eut l'idée de s'adresser aux lapins nouveau-nés dont la flore gastro-intestinale est très pauvre en microbes. Chez des lapins âgés de 8 jours, Tissier (23) n'a trouvé que des streptocoques et une espèce de diplocoques. L'expérience a fort bien réussi chez des jeunes lapins auxquels on fit avaler des cultures de choléra, surtout lorsqu'on ajouta des microbes favorisants.

Il y avait donc lieu de supposer que, pour la fièvre typhoïde expérimentale, il en serait de même, si les bacilles d'Eberth rencontraient des microbes antagonistes dans la flore bactérienne très riche de l'intestin. Guidé par cette considération, nous avons expérimenté sur de jeunes lapins et, pour plus de certitude, nous avons adjoint, dans la plupart des cas, aux cultures typhiques, la *torula rosea*.

Les cultures typhiques étaient d'abord introduites dans la bouche, suivant la technique de Metchnikoff, au moyen d'une baguette en verre avec laquelle on avait raclé la surface de la gélose; plus tard, je préparais une émulsion de bacilles typhiques que je faisais avaler aux jeunes lapins, au moyen d'une tétine en caoutchouc. Les deux procédés donnent de bons résultats.

Les cultures typhiques étaient toujours âgées de 24 heures; celles de *torula* étaient du même âge, la plupart du temps; ce n'est que dans des cas très rares que j'employais des cultures de *torula* âgées de 2-3 jours, quand celles de 24 heures étaient trop pauvres. Au cours de mes expériences j'ai eu à ma disposition quatre origines différentes de bacille typhique. La culture (A), dont je me suis servi au début, était peu virulente; la culture (B), âgée de 24 heures, tuait un cobaye de 300 grammes en 22 heures, en injection intrapéritonéale; elle n'était donc pas bien virulente non plus. La culture (C), que j'ai isolée du cœur du cobaye infecté avec (B), s'est montrée

plus virulente : $\frac{1}{5}$ de culture de 24 heures sur gélose tuait un cobaye de 340 grammes en 16 heures, en injection intrapéritonéale. Les résultats les plus sûrs ont été obtenus avec cette même race, ayant fait deux passages par le cobaye. Cette culture, que nous appelons (D), tuait un cobaye de 310 grammes en 19 heures, à la dose de $\frac{1}{5}$ de culture de 24 heures sur gélose, en injection intrapéritonéale. Les jeunes lapins recevaient toujours une culture entière et restaient pendant tout le temps auprès de leurs mères.

Première série d'expériences.

Le 10 juin 1903, on introduit *per os* chez 4 petits lapins, âgés de 10 jours, la culture typhique B, mélangée avec la *torula rosea*. Les animaux ne manifestent pendant plusieurs jours aucun symptôme morbide. Le 20 juin on leur administre un mélange de la culture C. et de *torula*. Les lapins résistent bien. Le 24 et le 26 juin on répète l'opération. Les lapins ne présentent rien d'anormal. Les résultats négatifs de cette expérience doivent évidemment être attribués à la faible virulence de la culture B.

Deuxième série d'expériences.

Le 8 juin on injecte *per os* un mélange de bacille typhique A et de *torula* à 5 petits lapins âgés de 7 jours. Le 11 juin on introduit chez trois autres lapins de même portée (âgés de 10 jours), par la même voie, un mélange de bacille typhique B et de *torula rosea*. Le 24 juin, tous les lapins (7), sauf un (n° 8), reçoivent un mélange de culture C + *torula*. Le 27 juin, les mêmes 7 lapins reçoivent une culture de bacille D + *torula rosea*. Ils n'accusent aucun signe de maladie. Le 29 juin, je les ai séparés de leur mère. Le lendemain j'ai trouvé 2 petits lapins morts. Nous décrirons plus loin les résultats de l'examen anatomo-pathologique et bactériologique; faisons seulement remarquer que chez ces 2 lapins l'estomac renfermait des aliments et les intestins étaient pleins, ce qui doit écarter l'hypothèse de la mort par inanition. Le 30 juin, au matin, nous avons remis les 6 lapins restants dans la cage de leur mère et à cinq d'entre eux (le n° 8, n'est pas infecté, il sert de témoin), nous avons fait manger un mélange de bacilles D et de *torula rosea*. Sur ces 5 lapins inoculés, un meurt dans la nuit du 1^{er} au 2^e juillet, 2 meurent le 4 juillet; le 7 juillet il en meurt encore un. Sur la totalité de 8 lapins, 6 sont morts; 1 a résisté à l'inoculation, ainsi que le n° 8, qui a servi de témoin et n'a pas été injecté.

Troisième série d'expériences.

Contrairement aux animaux de la série précédente, dans cette troisième série, l'inoculation avait été faite une seule fois. Le 29 juin, 7 lapins, âgés de 13 jours, reçoivent un mélange de b. typhiques D. et de *torula rosea*; déjà

trois jours après, le 2 juillet, un de ces lapins est mort; il pesait au moment de l'inoculation 270 grammes; après la mort, son poids était de 230 grammes. Le 4 juillet, deux autres lapins sont morts (250-240 grammes, 260-220 grammes). Le 5 juillet, il y eut encore deux morts; leurs poids étaient au moment de l'inoculation et après la mort : 240-230; 240-210 grammes. Tous ces animaux accusaient, après l'inoculation, un état de dépression profonde; ils restaient immobiles dans leur cage, leurs poils étaient hérissés, les yeux à demi clos; ils ne réagissaient presque pas aux influences extérieures. Ils rendaient des matières molles sans avoir de diarrhée, à proprement parler. Le 6 juillet, il y eut encore un mort (300-340 grammes). Le dernier lapin est mort le 8 juillet, après avoir augmenté de poids de 50 grammes (290-340 grammes).

Les expériences de la 2^e et surtout de la 3^e série montrent donc d'une façon certaine que l'on peut déterminer chez les animaux une maladie mortelle en leur introduisant des cultures virulentes dans le tube digestif.

Pour résoudre la question du rôle que joue la *torula rosea* dans cette maladie expérimentale de jeunes lapins, nous avons fait une quatrième série d'expériences.

Quatrième série d'expériences.

Le 9 juillet on introduit dans la bouche de trois lapins, âgés de 11 jours, une culture de *b. typhique* D. non additionnée de *torula*. Le 13 juillet, on trouve un des lapins mort; le lendemain, un autre est mort; le troisième a survécu.

Examen anatomo-pathologique et bactériologique des lapins. —

Les lésions anatomo-pathologiques rappellent celles que l'on constate chez l'homme, mais elles présentent aussi quelques particularités. Le siège principal des lésions est le tube gastro-intestinal. On remarque tout d'abord des altérations dans l'intestin grêle, surtout au voisinage du gros intestin.

Il y a à ce niveau de l'hyperémie et des ecchymoses ponctuées, les plaques de Peyer sont augmentées, dans tous les cas, elles sont fortement hyperémiées et ont 9/10 de longueur sur 4/5 de largeur; ce qui frappe surtout, c'est leur épaissement; elles font saillie sur le tissu environnant beaucoup plus que cela n'a lieu chez les lapins normaux; dans les cas où la mort survenait au 6^e ou 7^e jour après l'inoculation, on a même pu observer des ulcérations au niveau des plaques de Peyer. Nous n'avons pas observé d'ulcérations très profondes, ce qui tient, évidemment,

à l'espèce animale employée, à l'âge des animaux et surtout à la courte durée de la maladie, celle-ci n'ayant jamais dépassé 10 jours; or, chez l'homme, les ulcérations typhiques commencent seulement à se former après le 10^e jour. Nous devons signaler également des altérations du cœcum observées dans 11 cas sur 15 (73 0/0). Ces altérations se traduisent par une hyperémie intense des replis de cœcum, ainsi que par une hyperémie et des suffusions sanguines de son bout terminal. Dans un grand nombre de cas (53 0/0), nous avons constaté, au niveau de la muqueuse stomacale, une forte hyperémie et des suffusions sanguines assez étendues, ayant atteint dans un cas les dimensions d'une pièce de 10 francs; ce fut le cas chez un lapin de la 3^e série, mort le 6^e jour après l'infection; ces lésions étaient le plus prononcées au niveau de la grande courbure, près du pylore; parfois, il y avait également une hyperémie du duodénum. Dans trois cas (20 0/0), nous avons constaté de l'hyperémie du côlon.

La rate a été normale dans un cas seulement; dans tous les autres cas, elle était augmentée de volume, foncée, souvent de consistance friable. Le foie était également augmenté de volume, fortement hyperémié. Les poumons étaient normaux. Dans un cas, le liquide péritonéal était trouble (ascite); dans un autre cas, il y eut, en plus, une péricardite adhésive. Les reins étaient hyperémiés; la capsule s'enlevait facilement dans tous les cas. La vessie était tantôt pleine, tantôt vide. L'estomac renfermait toujours des aliments; le contenu intestinal était, dans la majorité des cas, de consistance molle, mais jamais liquide.

L'examen histologique des plaques de Peyer a montré que l'épithélium de la muqueuse manque et laisse à nu les couches sous-jacentes; la muqueuse et la sous-muqueuse sont très infiltrées; il y a des hémorragies; les replis du cœcum présentent des lésions analogues, avec cette différence que l'épithélium est conservé. Sur les coupes on voit un grand nombre de bacilles sous forme d'amas; ils sont situés dans la muqueuse et la sous-muqueuse; certains d'entre eux sont englobés par les phagocytes.

Dans tous les cas (15) qui s'étaient terminés par la mort, nous avons ensemencé en bouillon et sur gélose le sang, la rate, les parois intestinales et les plaques de Peyer; dans 3 cas, j'ai ensemencé, en plus, le foie. A l'examen du sang, nous avons

pu constater le b. typhique dans 12 cas; dans 2 cas, il était associé au bac. coli comm. Dans les 3 autres cas, le b. typhique a été constaté dans les parois intestinales (1 fois) et dans la rate (2 fois). Dans la rate, le b. typhique a été constaté 12 fois. Dans les parois intestinales et dans les plaques de Peyer, le bacille d'Eberth a été vu 9 fois.

Nous voyons donc que, chez tous les lapins morts, nous avons pu trouver le bacille typhique tantôt dans un organe, tantôt dans plusieurs à la fois. Nous pouvons donc affirmer qu'il s'agit, dans tous ces cas, d'une fièvre typhoïde expérimentale, à localisations gastro-intestinales.

Pour différencier le b. d'Eberth du colibacille, nous faisons desensemencements dans du lait, sur gélose lactosée et tournesolée; nous avons également recours à l'agglutination; à cet effet, nous nous sommes servi du sérum d'une chèvre immunisée contre le b. typhique; ce sérum nous a été fourni par le docteur Besredka, auquel nous exprimons ici notre vive reconnaissance. Un essai préliminaire nous a montré que ce sérum agglutinait le bacille typhique D. dans la proportion de 1 : 100,000, alors qu'il n'agglutinait le colibacille qu'à la proportion de 1 : 40; en nous aidant de ce réactif si sensible, ainsi que des deux milieux indiqués plus haut, nous étions à même d'éviter toute erreur.

Le rôle de la torula dans l'infection typhique. — Nous avons vu que la *torula* favorise le développement de b. d'Eberth. En est-il de même *in vivo*? Il suffit de comparer les expériences de la 3^e et de la 4^e série, pour répondre affirmativement. Dans la 3^e série, où les animaux étaient infectés avec le mélange de b. typhique et de *torula*, nous avons pu constater des morts dès le 3^e jour; de plus, tous les 7 lapins ont fini par succomber. Dans la 4^e série, où l'inoculation fut pratiquée 2 fois avec la culture D. seule, sans addition de *torula*, la mort eut lieu le 7^e jour, et sur 3 lapins, 1 a survécu. Si nous ajoutons à cela que les animaux de la 3^e série étaient un peu plus âgés que ceux de la 4^e série, ce qui est un facteur très important, le rôle de la *torula rosea* devient incontestable.

CONCLUSIONS

1. On peut déterminer chez les lapins une fièvre typhoïde expérimentale en introduisant des bacilles typhiques dans leur

tube digestif; il est nécessaire pour cela que les animaux soient très jeunes.

2. Les altérations anatomo-pathologiques de cette fièvre typhoïde expérimentale des jeunes lapins rappellent celles que l'on observe chez l'homme, surtout chez les enfants; les ulcérations profondes sont relativement rares.

3. Les différentes espèces de *torula*, et surtout la *torula rosea*, favorisent l'infection.

4. La fièvre typhoïde expérimentale, provoquée par l'introduction du virus dans le tube gastro-intestinal, se prête mieux à l'étude des questions de prophylaxie et de traitement que l'infection produite par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) KOLLE u. WASSERMANN, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Jena 1902. — *Antagonismus und Symbiose in Mischkulturen*, I, Zief, p. 122.
- 2) METCHNIKOFF, *Recherches sur le choléra et les vibrions*, 4^e mémoire, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.
- 3) ALB. KLOCKER, *Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis Alkoholgärungs gewerbe*, Stuttgart, 1900.
- 4) Prof. Dr PAUL LINDNER, *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben in die technische Biologie, Hefenreinkultur und Infektionslehre*, Berlin, 1901.
- 5) DE BARY, *Archiv. für Exper. Pathol.*, V, XX, 1886, p. 243.
- 6) CAPITAN et MOREAU, *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Soc. de Biologie*, 1889, p. 25.
- 7) METCHNIKOFF, *Recherches sur le choléra et les vibrions*.
- 8) Dr NEUFELD, *Die Pathogenität des Typhusbacillus für Thiere*, VII, Zief, p. 229.
- 9) *Zeitschr. f. Hyg.* Bd I, s. 489, 1886; Bd II, s. 110 u 382, 1887.
- 10) SIROTININ, *Ibid.*, Bd I, s. 465, 1886.
- 11) ALI-COHEN, *Dissert.*, 1886.
- 12) BAUMGARTEN, *Centralbl. f. Klin. Medic.*, 1887, n^o 4.
- 13) GILBERT et GIRARD, *Gazette méd. de Paris*, 1891, n^o 21.
- 14) PETROUSCHKY, *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd XXXII, s. 261, 1892.
- 15) GERMANO et MAUREAU, *Ziegl. Beitr.*, Bd XII, s. 494, 1893.
- 16) PFEIFFER u. KOLLE, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, Bd XXI, s. 203, 1896.
- 17) CHANTEMESSE et WIDAL, *Étude expérimentale sur l'exaltation, l'immu-*

nisation et la thérapeutique de l'infection typhique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

18) SANARELLI, Étude sur la fièvre typhoïde expérimentale, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

19) CHANTEMESSE et RAMOND, Fièvre typhoïde expérimentale, *Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de Biologie*, 1897, p. 719.

20) REMLINGER, Fièvre typhoïde expérimentale par contamination alimentaire, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1897.

21) *Zeitschr. f. Hyg.*, 1892, Bd. XII, p. 88.

22) *Zeitschr. f. Hyg.*, 1903, Bd. XLVIII, p. 491.

23) METCHNIKOFF, Les microbes intestinaux, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1903, n° 7, p. 266.

QUELQUES NOTES SUR LA MORPHOLOGIE & LA BIOLOGIE

DU BACTERIUM ZOPFII (KURTH)

PAR M. N. SWELLENGREBEL (D'AMSTERDAM)

Le bacterium Zopfii a été découvert et décrit pour la première fois par M. Kurth ¹, qui le trouva dans le contenu intestinal d'une poule. M. Kuhn ² isola ce bacille de matières putréfiées. M. Günther ³ le trouva dans une saucisse. M. Berlioz ⁴ remarque qu'on l'a trouvé aussi, dans le sang de canards, dans la terre et dans l'eau. Je l'ai trouvé dans du lait insuffisamment stérilisé. Il me semble donc qu'on est justifié de conclure que ce bacille s'associe à la plupart des procès de putréfaction.

Dans les grands ouvrages de bactériologie, on n'est pas d'accord sur les propriétés de B. Zopfii. D'ailleurs il n'a pas été l'objet de beaucoup de recherches. On l'a confondu souvent avec B. Zenkeri, B. vulgare et B. vulgare β mirabilis. Sans doute, B. Zopfii ressemble beaucoup à ces autres espèces, mais il s'en distingue par des propriétés constantes, et par conséquent, il faut le regarder comme une espèce bien marquée. Ce bacille se distingue de B. vulgare par la propriété de ne pas liquéfier la gélatine, et de B. Zenkeri, avec lequel il jouit de la même propriété par l'aspect caractéristique de la culture en piqure et sur plaques de gélatine.

Propriétés morphologiques. — Bac. Zophii est un bâtonnet de 2-5 μ sur 0,4-1 μ . Les bâtonnets sont réunis en longues chaînes ondulantes, dans lesquelles on ne peut souvent plus retrouver les différents individus. Le bacille est très mobile, grâce à de nombreux cils péritriches, qu'on peut apercevoir facilement, quand on les a colorés d'après les méthodes de Löffler ou de Bunge. Le bacille lui-même se colore facilement d'après les méthodes ordinaires, il prend le Gram, et il est aussi colo-

1. *Botanische Zeitung* 1883.

2. *Archiv für Hygiene*. Tome XIII n° 1.

3. *Archiv für Hygiene*, XXVIII, p. 153.

4. *Précis de bactériologie médicale*, p. 530. Paris, Masson, 1903.

nable d'après la méthode du médecin danois Claudius. (On colore une minute avec le violet de méthyle, puis on décolore par l'acide picrique et l'on traite par l'huile de girofle.)

Le bacille, cultivé pendant environ sept jours sur l'agar-agar, commence à produire des formes d'involution : des individus longs, gonflés irrégulièrement, à forme de massue, qui se divisent plus tard en particules minces. D'abord ces formes d'involution sont parfaitement colorables d'après la méthode de Claudius, plus tard elles ne conservent plus la couleur.

MM. Lehmann et Neumann¹ et M. Günther² disent que *B. Zopfii* ne produit pas de spores. M. Berlioz³ affirme au contraire, que ce bacille forme des spores ovoïdes de la même largeur que le bâtonnet lui-même, et qui sont situées à l'extrémité renflée du bâtonnet. J'avais déjà vu très souvent, dans les formes d'involution, des taches claires incolorables, mais j'avais cru qu'elles étaient la suite d'une plasmolyse ou d'une dégénération. Cependant, j'ai réussi à colorer ces taches d'après la méthode de Möller (bain d'acide chromique, fuchsine de Ziehl-Neelsen, décoloration par l'acide sulfurique, coloration des bacilles au bleu de méthylène). Il était donc possible que ces taches fussent des spores réelles. Pour résoudre cette question, j'aiensemencé des bacilles, qui contenaient les corpuscules que je prenais pour des spores, sur des plaques d'agar-agar. Celles-ci furent mises à l'étuve à 26° pendant 5 heures. Après ce temps, dans le cas où ces formations seraient des spores, on pouvait s'attendre à voir celles-ci commencer à germer. J'ai donc fait des préparations de cultures toutes les deux heures, et je les ai colorées d'après la méthode de Möller : on pouvait aisément suivre les phases de la germination, en comparant les différentes préparations. Les spores se crevassaient à l'un des pôles, ce qui permit à l'individu jeune de sortir. La membrane de la spore restait le plus souvent adhérente au bâtonnet nouveau-né, même quand celui-ci commençait à se multiplier. La membrane de la spore, après la germination, ne conservait pas toujours la couleur rouge : quelquefois elle fut décolorée par l'acide sulfurique et se montrait par conséquent teinte en bleu. Ceci n'est

1. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie München*. J. F. Lehmann, 1904.

2. *Einführung in das Studium der Bakteriologie*. G. Thieme, Leipzig, 1902.

3. *Loc. cit.*

pas d'accord avec la remarque de M. Alfr. Fischer ¹ qui affirme que la membrane de la spore conserve sa propriété de ne pas se décolorer dans les acides, même après la germination.

Propriétés culturales. — En ce qui concerne les propriétés culturales de *B. Zopfii*, les auteurs ne sont pas toujours d'accord, mais ils s'accordent tous sur le mode de développement sur plaques de gélatine. Aussi cette culture est très caractéristique, et elle fournit une des propriétés les plus importantes de ce micro-organisme. Les colonies ont des noyaux blancs, d'où rayonnent plusieurs minces rejetons. Observant ces colonies au microscope, par exemple à 405 : 1, on remarque une partie centrale opaque, d'où rayonnent les rejetons, qui sont composés à leur tour de petites colonies rondes ou ovales, transparentes et de couleur jaunâtre. Elles sont situées l'une auprès de l'autre, en formant ainsi de longues chaînes. Parmi ces chaînes, on observe des « spirulines » : des paquets de fils ondulants ou étendus. M. Berlioz ² affirme que *B. Zopfii* ramollit la gélatine, puis la liquéfie lentement. Je n'ai jamais pu constater aucune trace de liquéfaction; MM. Lehmann et Neumann ³ et M. Günther ⁴ disent que la liquéfaction n'a jamais lieu.

Quant à la culture par piqûre dans la gélatine, les témoignages des auteurs diffèrent considérablement, MM. Lehmann et Neumann ³ affirment que les bacilles se développent très bien, le long de la piqûre, et qu'ils produisent des rejetons transversaux dans la gélatine. A la surface le développement a lieu sous la forme d'une mince voile, où on observe souvent de fins fils qui s'étendent dans la voile. M. Günther ⁴, au contraire, nie que le développement ait lieu le long de la piqûre et dit que ces bacilles ne croissent qu'à la surface de la gélatine. M. Berlioz ² est d'accord avec MM. Lehmann et Neumann, en ce qui concerne le développement au-dessous de la surface. J'ai fait plusieurs cultures par piqûre en gélatine, mais je ne pouvais d'abord constater que le développement à la surface. Ceci ayant lieu à la température de la chambre, j'ai mis mes cultures à l'étuve à 22°. Alors le développement eut lieu aussi le long de la piqûre, d'après le mode précédemment décrit.

1. A. FISCHER, *Vorlesungen über Bakterien*, p. 40. Jena, G. Fischer.

2. *Loc. cit.*

3. *Loc. cit.*

4. *Loc. cit.*

La culture en plaques d'agar-agar montre des variations considérables dans le mode de développement, MM. Lehmann et Neumann¹ indiquent qu'à l'œil nu, elle se montre comme une petite colonie d'un blanc grisâtre, aux rejetons minces et innombrables, puis s'entoure graduellement d'une zone transparente.

Peu de temps après, toute la surface est couverte d'un voile grisâtre. Regardée à un grossissement de 50 elle a l'aspect d'une pelote de fils très minces aux ramifications multiples. D'abord elle se colore en jaune, puis en jaune brunâtre. Je pouvais constater deux types : l'un était identique à celui de MM. Lehmann et Neumann, l'autre était plus robuste, quoique de même construction. Quand on ensemençait de ces deux types sur agar-agar incliné, les bacilles provenant des deux types se développaient de la même manière : une couche mince et transparente où se répandaient des fils fins. Ce mode de développement sur l'agar-agar incliné est d'accord avec les observations de MM. Lehmann et Neumann, seulement ces auteurs remarquent que la production des fils n'a lieu que très rarement, tandis que dans ma culture, elle était la règle.

La culture en bouillon présentait de grandes variations, selon la température. M. Berlioz remarque que le bouillon se trouble et qu'il se forme un voile mince et fragile. MM. Lehmann et Neumann, au contraire, affirment que le bouillon reste absolument clair et qu'il ne se forme pas de voile, mais un sédiment faible.

J'ai reconnu que le bouillon ne se trouble pas quand on l'a mis à la température de la chambre et il n'y avait point de voile, mais seulement un sédiment; ceci est donc d'accord avec le témoignage de MM. Lehmann et Neumann; quand on met la culture à l'étuve à 26°; il se forme un voile quelquefois très mince, quelquefois plus épais, qu'on peut aisément détruire en agitant l'éprouvette. Une fois le voile détruit, il ne se reforme plus. Je n'ai observé dans aucune circonstance que le bouillon se troublât. La réaction est alcaline. M. Günther remarque que le développement dans le bouillon devient de plus en plus faible quand la température s'accroît et qu'on ne peut plus le constater à une température de 30°. Je n'ai pu observer cette propriété

1. *Loc. cit.*

de B. Zopfii, au contraire : le développement se faisait à 30°, aussi bien qu'à la température de la chambre.

Les témoignages des auteurs sur le mode de développement sur pommes de terre et dans le lait s'accordent parfaitement. Mes cultures démontrèrent aussi les mêmes propriétés : sur pommes de terre, il se forme un voile d'un blanc grisâtre, qui ne couvre pas toute la surface de la pomme de terre. Dans le lait il ne s'opère pas de coagulation et la réaction ne change pas.

J'ai aussi essayé de cultiver B. Zopfii dans le liquide nutritif de Fraenkel et Voges¹ (on dissout dans un litre d'eau : chlorure de sodium, 5 gr. ; phosphate de soude, 2 gr. ; lactate d'ammoniaque, 6 gr. ; asparagine, 4 gr.) Dans ce liquide, le bacille poussait à merveille, formant de petits flocons blanchâtres, quoique le liquide n'ait pas été neutralisé, comme on le fait généralement.

Propriétés biologiques. — Les témoignages des auteurs sont très différents, en ce qui concerne le développement de B. Zopfii en bouillon, contenant du glucose ou du lactose. M. Günther² affirme que la réaction ne change ni dans le bouillon glucosé ni dans celui lactosé, qu'il ne se forme pas de gaz et que le développement ne se fait qu'assez faiblement dans ces liquides. MM. Lehmann et Neumann, au contraire, observèrent que ce bacille produit de l'acide dans le bouillon glucosé. Ils eurent besoin de 0,25 c. c. d'une solution normale de KOH pour neutraliser l'acide qui s'était formé dans 100 c. c. de bouillon. Ils ne recherchèrent pas l'action de B. Zopfii sur le lactose. J'ai ensemencé ce bacille dans les bouillons à 2 0/0 de glucose et à 2 0/0 de lactose et j'ai mis ces cultures à l'étuve à 26°. Après cinq jours, j'eus besoin de 1,46 c. c. de solution normale de KOH pour neutraliser l'acide de 100 c. c. de bouillon glucosé et 0,625 c. c. de cette solution pour le bouillon lactosé. Le développement avait été fort abondant; le bouillon glucosé s'était troublé et manifestait une odeur fétide, le bouillon lactosé était resté clair; mais il y avait dans le liquide des flocons blanchâtres. J'avais aussi mis ces bouillons dans des tubes de verre, recourbés pour démontrer la production de gaz, s'il y

1. *Hygienische Rundschau*, 1894.

2. *Loc. cit.*

en avait. Il ne s'en produisit pas, mais il se manifesta une différence marquée entre le développement en bouillon glucosé et en bouillon lactosé. Dans le premier, le bacille poussait aussi dans la partie fermée du tube, tandis que dans le bouillon lactosé, il ne se développait que dans la partie ouverte : dans ce premier milieu le bacille pouvait donc mieux se passer d'air que dans le second.

M. Günther¹ remarque que *B. Zopfii* ne produit pas d'indol, M. Kuhn² n'en a pas observé non plus. MM. Lehmann et Neumann³ réussirent à en démontrer la présence. Je crois que la propriété de ce bacille de former de l'indol est très variable et dépend des circonstances extérieures; la chaleur surtout favorise cette production. J'ai mis deux éprouvettes de bouillon pendant sept jours à la température de la chambre. Après ce temps, la réaction de l'indol ne se produisait pas. Alors j'ai mis deux éprouvettes pendant sept jours à l'étuve à 26° : la réaction se montra positive, quoique d'intensité différente. Puis j'ai répété la première expérience avec le même résultat négatif, et ensuite la deuxième avec une réaction positive et une négative. Une culture de sept jours (26°) dans une solution de peptone (2 0/0) donna une réaction fortement positive.

B. Zopfii produit une grande quantité de nitrite dans un milieu contenant un nitrate. Je l'aiensemencé dans du bouillon contenant du nitrate de soude et j'ai mis cette culture à l'étuve à 26° en présence d'une éprouvette de contrôle. Après sept jours, l'une des deux cultures se colora très vivement en bleu brunâtre, avec la solution d'iodure de potassium amidonnée additionnée d'acide sulfurique à 5 0/0, l'autre resta tout à fait incolore.

La production de H^2S par *B. Zopfii* est très variable, tantôt il en produit une assez grande quantité, tantôt il en produit si peu qu'on ne peut le mettre en évidence. Pour démontrer la présence de H^2S , je me suis servi de la méthode d'Ernst (culture en gélatine à tartrate de fer) qui est très sensible. L'addition de thiosulfate de soude ou de nitrite de soude n'augmentait pas la production de H^2S , mais le soufre libre la rendait plus abondante; quand on avait mis un peu de soufre dans la

1. *Loc. cit.*

2. *Loc. cit.*

3. *Loc. cit.*

gélatine, celle-ci, cultivée à 26°, s'était déjà colorée en noir le jour suivant.

Dans l'urine, le développement est très marqué. Il se forme une grande quantité de carbonate d'ammoniaque. La surface est couverte d'un voile assez épais ; le liquide se trouble.

J'ai observé aussi le mode de développement dans plusieurs milieux nutritifs, décrits par M. Alfred Fischer¹. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau ci-dessous. Afin de pouvoir comparer la manière dont B. Zopfii et B. vulgare se comportent envers ces milieux nutritifs, j'ai mis les résultats des expériences de M. A. Fischer pour B. vulgare à côté des miens.

No de l'expérience.	SOLUTION DE 1 0/0 DE		REMARQUES	B. Zopfii.	B. vulgare.
	Pour fournir l'Az.	Pour fournir le C.			
I....	Peptone.	Saccharose.	Trouble léger. Sédiment. Point de voile.	3	3
II...	—	Peptone.	Trouble léger. Sédiment. Point de voile.	3	3
III..	Pept. + KNO ³ .	—	Trouble irrégulier. Sédiment. Point de voile.	3	3
IV...	Asparagine.	Saccharose.		0	1?
V...	—	Asparagine.		0	0
VI...	Tartrate d'ammoniaque.	Glycérine.	Développement faible.	2	0
VII..	Tartrate d'ammoniaque.	Acide tartrique.		0	0
VIII.	Nitrate de soude.	Glycérine.		0	0
IX...	Sulfate d'ammoniaque.	CO ² de l'air.	Développement très faible en forme de fils.	1 ?	0
X	N. de l'air.	Saccharose.		0	0
...					

3 = Développement abondant.
 2 = Développement moins abondant.
 1? = Développement qu'on peut à peine constater.

B. Zopfii produit, dans une culture en bouillon, du protéinochrome, qu'on peut aisément démontrer d'après la méthode de

¹ Loc. cit.

MM. Erdmann et Winternitz ¹ (ajouter à la culture une solution aqueuse de chlore ou de brome), la culture se colore en violet clair.

Place du Bacterium Zopfii (Kurth) dans les différents systèmes bactériologiques. — Sans doute B. Zopfii accuse quelque parenté avec B. vulgare. Ce dernier bacille a un caractère plus purement saprophyte et décompose plus énergiquement les matières organiques, ce qui se démontre par le développement insignifiant de B. vulgare dans un milieu dépourvu d'albumine, par la production plus grande de H²S et d'indol, par la liquéfaction de la gélatine, etc. Hauser a démontré que Bacterium vulgare B. mirabilis, qui ne liquéfie la gélatine que très lentement, et Bacterium Zenkeri, qui ne la liquéfie pas et ne produit que peu de H²S, ne sont que des races de B. vulgare, qu'on peut transformer l'une en l'autre à son gré. Par cette propriété, la ressemblance de B. vulgare et B. Zopfii devient plus étroite encore.

Dans le système de Hüppe ³, les bâtonnets sont divisés en deux genres : 1° Bacterium (point de production de spores); 2° Bacillus (production de spores). Puisque B. Zopfii produit des spores, il faut ranger ce bacille sous le genre Bacillus; ainsi B. Zopfii et B. vulgare sont séparés l'un de l'autre dans ce système, ce qui n'est pas d'accord avec leur parenté évidente.

Dans le système de M. Migula ⁴, on divise les bâtonnets en trois genres : 1° Bacterium (point de cils); 2° Bacillus (cils diffus); 3° Pseudomonas (cils polaires); la parenté est donc exprimée plus clairement; il en est de même avec le système de M. Macé ⁵, où les genres Bacterium et Bacillus sont réunis en un seul : Bacillus. Ainsi on ne fait attention ni à la production de spores ni aux cils, ce qui offre l'avantage de n'être pas obligé de changer la place qu'occupe un bacille dans le système, aussitôt qu'on a découvert des cils ou des spores chez ce bacille.

C'est dans le système de M. A. Fischer ⁶ qu'on met le mieux en évidence l'alliance entre B. vulgare et Zopfii. Cet auteur divise les bâtonnets (famille des Bacillacées) selon leur forme

1. *Münchener mediz. Wochenschrift*, 1903, n° 23. *Ref. Centralbl. f. Bakt.*

2. *Centralbl. f. bakt.* Tome XII, p. 360.

3. *Die Formen der Bakterien.*

4. *System der Bakterien.*

5. *Traité de bactériologie.*

6. *Loc. cit.*

extérieure en trois sous-familles : 1° Bacillacées (bâtonnets qui ne se changent pas en formant des spores et ceux chez qui on n'a pas encore découvert de spores); 2° Clostridiacées (bâtonnets adoptant la forme du clostridium butyricum en formant les spores); 3° Plectridiacées (bâtonnets adoptant la forme de Bac. tetani en formant les spores). Il divise la sous-famille des Bacillacées en 4 genres : 1° Bacillus (immobile); 2° Bactrinium (cils monotriches); 3° Bactrillum (cils lophotriches); 4° Bactridium (cils péritriches). Dans ce système-ci, on réunit B. Zopfii et B. vulgare (B. mirabilis et Zenkeri) dans le même genre : Bactridium, qui est plus restreint que dans tout autre système et ainsi l'alliance est fort bien mise en évidence. Selon la nomenclature de ce système, il faut donc désigner Bacterium Zopfii (Kurth) sous le nom de Bactridium Zopfii (A. Fischer.)

Le gérant : G. MASSON.



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 5.



Fig. 6.



Fig. 4.



Fig. 7.



Fig. 8.



Fig. 9.

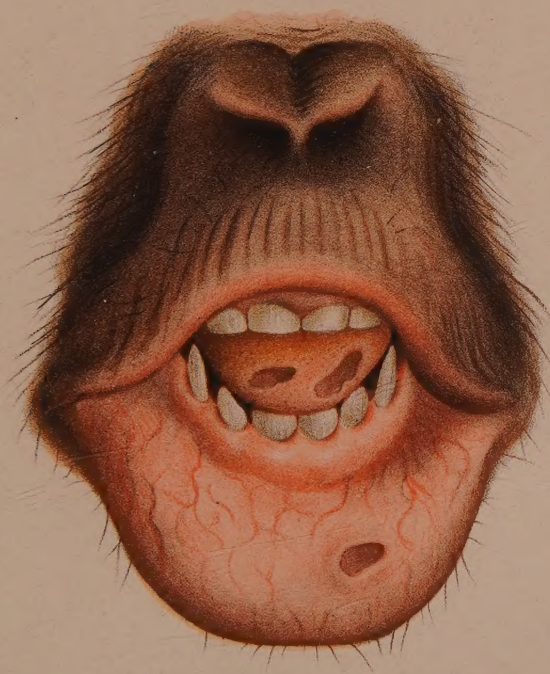


Fig. 10.

